

SARA DE JESUS OLIVEIRA

***“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE NA
REGIÃO DE CAMPINAS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE-INFECÇÃO
E NAS DIFERENTES FORMAS DA DOENÇA”***

CAMPINAS

2003

SARA DE JESUS OLIVEIRA

**“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
NA REGIÃO DE CAMPINAS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
CELULAR NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE-INFECÇÃO
E NAS DIFERENTES FORMAS DA DOENÇA”**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor
em Ciências Médicas, na área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^A. DRA. MARIA HELOÍSA SOUZA LIMA BLOTTA

CAMPINAS

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

0142

Oliveira, Sara de Jesus

Estudo epidemiológico da paracoccidiodomicose na região de Campinas e avaliação da resposta imune celular na paracoccidiodomicose - infecção e nas diferentes formas da doença. / Sara de Jesus Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Maria Heloísa Souza Lima Blotta
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Epidemiologia. 2. Linfócitos T. 3. Interleucina. 4. Paracoccidiodes brasiliensis. I. Maria Heloísa Souza Lima Blotta. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	0142
V	EX
TOMBO BC/	55731
PROC.	16-124/03
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/09/03
Nº CPD	

CM001BB142-4

BIBID 300901

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

DEDICATÓRIA

*A Heloísa Blotta, pela amizade e confiança, e por ser uma
pessoa assim, tão especial...*

*Ao Ronei Luciano, pela disponibilidade e grandeza de coração.
Pelas vezes em que foi o meu braço direito e por outras tantas
em que foi os meus dois braços!*

AGRADECIMENTOS

*A todos aqueles que, por amor a arte, colaboraram para a
realização deste trabalho.*

*A todos aqueles que possuem o talento especial de serem
“pessoas -chaves” ...*

*A Deus, por me permitir o privilégio de chegar até aqui,
contando com verdadeiros amigos e com essas
“pessoas-chaves”, cujo dom maior é o de abrir portas,
encurtando caminhos !!!*

Ainda que eu falasse todas as línguas...
Ainda que eu tivesse o dom das profecias,
Ou conhecesse todos os mistérios e toda ciência.
Ainda que tivesse toda fé para transportar montanhas...
Se eu não tivesse Amor, nada seria...

I Coríntios 13, 1-3.

	PÁG.
RESUMO	<i>x</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO	15
2- OBJETIVOS	27
3- ARTIGO I	29
4- ARTIGO II	35
5- DISCUSSÃO	42
6- CONCLUSÕES	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8- APÊNDICE	71

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FA	Forma adulta da paracoccidiodomicose
FJ	Forma juvenil da paracoccidiodomicose
gp43	Glicoproteína de 43 kDa do <i>P. brasiliensis</i>
GM-CSF	Fator estimulador do crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos
HC/UNICAMP	Hospital das clínicas da UNICAMP
HTT	Reação de hipersensibilidade do tipo tardio
IL	Interleucina
IFN	Interferon
LPS	Lipopolissacarídeo de parede bacteriana
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NO	Óxido nítrico
PCM	Paracoccidiodomicose
PI	PCM-infecção
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Th	Linfócitos T auxiliares
TGF	Fator de transformação de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral



RESUMO

A paracoccidiodomicose, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina, acometendo hoje mais de 10 milhões de pessoas e apresentando as maiores taxas de mortalidade nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.

A infecção se dá pela via respiratória sendo que a grande maioria de indivíduos que entram em contato com o fungo, não desenvolve a doença. Esta condição chamada PCM-infecção ocorre em indivíduos que moram em áreas endêmicas e apresentam teste cutâneo de HTT positivo aos antígenos do fungo. A progressão de infecção para doença origina duas formas clínicas principais: a forma aguda ou juvenil (FJ), de maior gravidade e a forma adulta ou crônica (FA), mais localizada e menos agressiva.

Com o objetivo de estudar a epidemiologia e o perfil imunológico da PCM humana na cidade de Campinas, analisamos as características gerais (sexo, idade profissão) de pacientes atendidos no HC da UNICAMP e a incidência da doença na região, juntamente com seus fatores de risco e suas formas clínicas. Avaliamos também a resposta imune celular (proliferação de linfócitos a antígenos do fungo e produção de citocinas do tipo Th1 e Th2), em pacientes com as formas adulta e juvenil da doença, indivíduos portadores da infecção e controles saudáveis (teste cutâneo de HTT negativo).

Nossos resultados mostraram que a PCM é endêmica em Campinas e região, acometendo em sua maioria, indivíduos adultos do sexo masculino, trabalhadores rurais e da construção civil. No entanto, encontramos elevado número de pacientes do sexo feminino e crianças com a forma juvenil da doença, mais grave e disseminada. Esses pacientes apresentam resposta imune celular suprimida, caracterizada por teste cutâneo negativo e proliferação de linfócitos reduzida a antígenos do fungo, enquanto produzem citocinas do tipo Th2, com aumento de IL-4 e IL-5, juntamente com baixos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-12. Apresentam também, no período inicial da infecção, número elevado de eosinófilos no sangue periférico e em biópsias de linfonodos.

Ao contrário, indivíduos portadores da PCM-infecção apresentam proliferação de linfócitos bastante acentuada a antígenos do fungo, teste cutâneo positivo, ausência de anticorpos e padrão de resposta Th1 com produção de IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-12, e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10.

Já os pacientes com a forma adulta apresentam resposta imune celular preservada, com teste cutâneo que variam de acordo com a forma unifocal ou multifocal da doença. De modo geral, produzem menores níveis de IL-4 e IL-5 e níveis aumentados de TNF- α e IL-12.

Esses resultados nos permitiram situar a forma adulta da paracoccidiodomicose como intermediária entre o padrão Th2 de resposta imune apresentado pela forma juvenil e o padrão Th1 desenvolvido pelos indivíduos portadores da PCM-infecção.



ABSTRACT

We studied the clinical-seroepidemiological characteristics of patients with paracoccidioidomycosis (PCM) attended at the University Hospital at UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil). The study group consisted of 584 individuals (492 M, 92 F) with ages ranging from 5 to 87 years. The highest incidence of the disease occurred between the ages of 41 and 50 years for men and 11 and 40 for women. Rural activities were the principal occupation of 46% of the patients. The diagnosis was confirmed by histopathological examination and by demonstration of fungus in scrapings, secretions or in the sputum. Serological tests for PCM were positive in 80% of the 584 patients studied. The significant number of patients, including 33 children under 14 years old, is an indication of the fungus' presence in the area and indicates that this region is an important endemic area for paracoccidioidomycosis. Cellular immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens (PbAg) was evaluated in patients with the juvenile (JF) and adult (AF) forms of paracoccidioidomycosis (PCM) as well as in a group of infected individuals living in the endemic area but without any clinical manifestation of the disease. The immune profile of this group of PCM-infected (PI) individuals was characterized by: 1) a positive skin test to *P. brasiliensis* antigen, 2) absence of specific antibodies, 3) a vigorous lymphoproliferative response to PbAg, and 4) a typical Th1 pattern of cytokines, with production of IFN- γ , IL-2, IL-12 and TNF- α and basal levels of IL-4, IL-5 and IL-10. At the opposite end of the spectrum were the JF patients whose proliferative response to PbAg was significantly impaired and whose cytokine pattern was characteristically Th2, i.e., lower IFN- γ TNF- α and IL-12 secretion and significantly higher levels of IL-4 and IL-5. These profiles are compatible with forms of higher and lower resistance, respectively. Intermediate immune responses were observed in AF patients, whose specific lymphoproliferative response was lower than in the PI group but higher than in the JF patients. The secretion of IFN- γ and IL-10 did not differ from the JF group, although IL-4 and IL-5 levels were significantly lower, and TNF- α and IL-12 higher. Since AF patients are able to control fungal dissemination for decades, they can be considered more resistant than JF patients, who manifest the disease soon after infection.



1- INTRODUÇÃO

Existem hoje mais de 10 milhões de pessoas infectadas com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica de maior prevalência na América Latina (MC EWEN et al, 1995). A maior casuística da doença é registrada no Brasil, com mais de 80% dos casos, seguida da Argentina, Venezuela e Colômbia (LACAZ et al, 2002). Atinge indivíduos moradores de zonas suburbanas e mesmo urbanas de todas as profissões, mas principalmente trabalhadores rurais e da construção civil (RESTREPO, 1985; COUTINHO et al, 2002).

A PCM é apontada como a 8ª causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas, apresentando a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, sendo comparada às grandes endemias como a doença de Chagas, tuberculose, malária, esquistossomose, sífilis e hanseníase. As regiões Sudeste e Sul do Brasil apresentaram, no período de 1980 a 1995, as maiores taxas de mortalidade pela doença (COUTINHO et al, 2002), com média anual de 1,45 por milhão de habitantes, sendo que somente o Estado do Paraná apresentou 53,2% das mortes por PCM registradas na região (FUNASA, 2000).

A incidência da doença não é homogênea dentro da área endêmica, na qual a estimativa anual é de 3 casos por 100 mil habitantes. Tal variação pode ser observada no Norte do Estado do Rio Grande do Sul, onde a incidência é de 6,6 casos por 100 mil habitantes, enquanto que na região Sul do país, é de 1,7 (LONDERO e RAMOS, 1990; WANKE e LONDERO, 1994).

A inserção da doença como um grave problema de saúde pública reside no fato de acometer principalmente homens na fase mais produtiva da vida, visto que 84,75% dos casos ocorre entre 30 e 59 anos (NEGRONI, 1993; WANKE e LONDERO, 1994). O alto custo social e econômico é devido não só a doença em atividade, mas às seqüelas secundárias à infecção, que incapacitam o indivíduo para o trabalho (BARBOSA, 1991; BRUMMER, et al, 1993; MOTA, 1996).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico saprófita do solo, de habitat natural ainda desconhecido (MC EWEN et al, 1995), reprodução assexuada e com crescimento filamentosos lento à temperatura ambiente. Nos tecidos do hospedeiro ou

cultivado a 37°C, cresce em 1 a 2 semanas, formando colônias leveduriformes com dupla membrana, bastante refringentes, com aspecto característico de roda de leme (FRANCO et al, 1989; SAN-BLAS, 1993).

Na natureza, o fungo se apresenta como estruturas filamentosas, contendo propágulos infectantes chamados conídios; sua estrutura antigênica é complexa e diferentes componentes exocelulares têm sido isolados, como a glicoproteína de peso molecular 43 kDa, conhecida como gp43. As cepas do *P. brasiliensis* variam quanto à virulência devido às diferenças entre os polissacarídeos da parede celular. Entretanto, podem existir outros fatores envolvidos na patogenicidade do fungo, como enzimas que degradam compostos da matriz extracelular, ajudando o microrganismo a invadir os tecidos (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977).

O *P. brasiliensis* é encontrado predominantemente em regiões de clima úmido, com temperaturas médias de 17 a 24°C, alto índice pluviométrico, altitude média, solo ácido e vegetação densa, como florestas tropicais e subtropicais (RESTREPO, 1985; BRUMMER et al, 1993).

O longo período de latência da doença impede a determinação precisa do local onde foi adquirida, fato que levou BORELLI (1972) a propor o termo “reservárea”, para localizar o habitat natural do fungo, onde se adquire a infecção primária. Atualmente, o uso de fungicidas agrícolas tem dificultado ainda mais o isolamento do *P. brasiliensis* do seu ambiente natural (ONO, 2000). O conceito de reservárea é distinto de área endêmica, que se refere ao local onde a micose é diagnosticada e onde se encontra a maioria dos doentes.

O desmatamento acelerado e o revolvimento do solo para plantio deixam o fungo em suspensão na atmosfera, facilitando a contaminação humana e favorecendo a formação de áreas hiperendêmicas, com as mais altas percentagens de adultos jovens infectados (GIMENEZ, 1998; FONSECA et al, 1999). Algumas cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* foram isoladas de plantações de café, em solo mineiro, reforçando a hipótese da aquisição da infecção durante atividades na agricultura (SILVA-VERGARA et al, 1998).

Acredita-se que a infecção por *P. brasiliensis* se dá por via respiratória, pela inalação de conídios que se transformam em leveduras, parasitando os tecidos do hospedeiro (FRANCO et al, 1987). A partir daí, pode ocorrer disseminação fúngica por via linfática ou hematogênica, quando o parasita adere e penetra o endotélio dos vasos sanguíneos para invadir tecidos mais profundos (KULLBERG e ANAISSIE, 1998). A infecção primária pode regredir com a destruição do fungo, permanecer na forma latente com organismos viáveis ou progredir comprometendo outros locais do organismo do hospedeiro, levando ao aparecimento dos sintomas. A progressão de infecção para doença depende do tamanho do inóculo, da patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro (BRUMMER et al, 1993). Alguns fatores de risco parecem estar associados à doença, como o tabagismo e etilismo (LONDERO e RAMOS, 1990; MARTINEZ e MOYA, 1992).

A aparente resistência das mulheres à doença é devido à presença de níveis adequados do hormônio estradiol, que inibe a transformação de micélio para a forma infectante de levedura (RESTREPO et al, 1984; SALAZAR et al, 1988; SEVERO et al, 1998).

Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença. Esse fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (HTT) positivo para antígenos do fungo, mas não apresentam qualquer sintoma da doença (BETHLEM et al, 1999; WANKE e LONDERO, 1994). Essa condição, denominada PCM-infecção, é muito mais comum do que a PCM-doença, embora não estejam estabelecidos os índices precisos dessa relação (SOUTO et al, 2000). Alguns estudos mostram que o índice de infecção varia em diferentes populações dentro de áreas endêmicas (2 a 60% de positividade), com maior incidência em comunidades rurais (RESTREPO, 1985; CADAVID e RESTREPO, 1993).

Quando a doença se estabelece, é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupada em 2 formas principais e polares: a forma adulta ou crônica (FA), geralmente mais localizada e menos agressiva, e a forma juvenil (FJ) ou aguda, mais grave e disseminada. Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se

comprometida, e a ausência de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (BENARD et al, 1996; LACAZ, 2002).

A forma juvenil ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando menos de 10% da casuística geral da doença. A avaliação clínica desses pacientes evidencia a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando doenças linfoproliferativas. Nestes casos a evolução da doença é rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço, linfonodos e medula óssea).

Os pacientes de forma juvenil apresentam resposta imune humoral preservada, com aumento da produção de anticorpos específicos do tipo IgA, IgE e IgG4 (BENARD et al, 2001; MAMONI et al, 2002), enquanto a resposta imune celular a antígenos do fungo está severamente deprimida (MOTA et al, 1985; MUSATTI et al, 1994; BENARD et al, 1996). A análise histopatológica das lesões mostra reação inflamatória com formação de granulomas frouxos, observando-se multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (FRANCO et al, 1987).

A forma adulta ou crônica ocorre em aproximadamente 90% dos pacientes, com progressão lenta e insidiosa, podendo levar meses ou anos para se estabelecer, como resultado da reativação de um foco latente da infecção fúngica. A forma crônica pode ser leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde uma ulceração oral isolada até o envolvimento pulmonar difuso. Pode apresentar-se de forma localizada (unifocal), sendo o pulmão o órgão mais atingido, mostrando múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia a esforços.

A forma crônica multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, além dos pulmões, apresentando sintomas variados com lesões na mucosa oral, nasal, pele, linfonodos, e em menor escala nas glândulas adrenais, intestinos e sistema nervoso central (FRANCO et al, 1987; BRUMMER et al, 1993). A resposta imune humoral caracteriza-se pela produção de níveis elevados de anticorpos do tipo IgG1 na forma crônica unifocal, e de IgG4 e IgE na forma multifocal (MAMONI et al, 2002). Pacientes com a forma crônica geralmente apresentam teste intradérmico positivo e achados histopatológicos mostrando

granulomas epitelióides compactos, que circundam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (MONTENEGRO, 1986).

O diagnóstico laboratorial definitivo da doença é obtido pela análise anatomopatológica de biópsias ou pelo achado do fungo no exame micológico direto em materiais clínicos. Nestes exames, que são de fácil execução e resultados rápidos, o *P. brasiliensis* mostra morfologia variada com brotamentos simples ou múltiplos (LACAZ et al, 2002). O isolamento do fungo pode ser feito através de cultura em meios específicos, com crescimento entre 7 a 10 dias, quando incubados a 37°C ou de 20 a 30 dias, quando mantido à temperatura ambiente (MATTOS et al, 1991).

A intradermorreação é de grande valor na realização de inquéritos epidemiológicos para avaliar a incidência da PCM-infecção, indicando que o contato com o fungo é freqüente durante as duas primeiras décadas da vida (LONDERO e RAMOS, 1990; MANGIATERRA et al, 1996). É útil também no diagnóstico e na avaliação do estado imunológico do paciente, pois a reversão do teste negativo pós-terapia indica resposta imune celular restaurada (BRUMMER et al, 1993; WANKE e LONDERO, 1994; SILVA-VERGARA, 1998). Atualmente, o antígeno mais utilizado para as reações intradérmicas é a gp43 purificada do *P. brasiliensis*, que apresenta resposta superior àquela obtida com o antígeno polissacarídico de Fava-Neto (SARAIVA et al, 1996).

A detecção de anticorpos específicos contra o fungo é um valioso auxílio no seguimento terapêutico, seja para avaliar a resposta satisfatória ao tratamento com a queda de títulos de anticorpos, seja para verificar o diagnóstico de recidiva. Neste caso, a elevação do título de anticorpos costuma preceder à piora clínica (TABORDA e CAMARGO, 1993; BLOTTA e CAMARGO, 1993).

Preparações antigênicas distintas têm sido empregadas nas técnicas sorológicas, mas a gp43 é a mais indicada, por tratar-se de um antígeno purificado e reconhecido por anticorpos presentes no soro da grande maioria dos pacientes com PCM (BLOTTA e CAMARGO, 1993; TABORDA et al, 1998; SOUZA et al, 2000). A detecção de anticorpos contra o *P. brasiliensis* pode ser realizada por diversas técnicas sorológicas: reação de fixação do complemento (FAVA NETO, 1955), imunodifusão radial dupla (RESTREPO,

1966; CAMARGO et al, 1988a), contraimuno eletroforese (CONTI-DIAS et al, 1973), reação de hemaglutinação (TABORDA e CAMARGO, 1993), ELISA de captura (CAMARGO et al, 1994) e Western blot (CAMARGO et al, 1988b; BLOTTA e CAMARGO, 1993), entre outras.

A imunodifusão dupla é o teste sorológico mais utilizado devido a sua especificidade, baixo custo, facilidade de execução e resultados rápidos (CAMARGO et al, 1998). Demonstra especificidade de 100% em pacientes com PCM, sendo recomendada como prova de triagem e permitindo o diagnóstico mais precoce da infecção (BLOTTA, 1993).

Os testes enzimáticos (ELISA) são de fácil execução, podendo fornecer resultados quantitativos, embora possam apresentar reatividade cruzada em pacientes que apresentam outras micoses como histoplasmose, aspergilose e doença de Jorge Lobo (MENDES-GIANNINI et al, 1990; BRUMMER et al, 1993). Os testes de ELISA e Western blot descritos atualmente, apresentam os melhores índices de sensibilidade, variando de acordo com a preparação antigênica e a técnica empregada.

CAMARGO et al (1994) utilizaram anticorpos monoclonais anti-gp43 para descrever um teste imunoenzimático de captura, capaz de detectar anticorpos com sensibilidade 20 vezes maior do que a técnica de ELISA tradicional. O Western blot apesar de mais específico, é um método ainda pouco utilizado, por apresentar resultados semiquantitativos e procedimento mais complexo. No entanto, essa metodologia mostrou-se adequada para acompanhamento sorológico de pacientes durante o tratamento, tanto na forma aguda como crônica da PCM (BLOTTA, 1993).

A detecção de antígenos circulantes pela técnica de ELISA, no soro (GOMEZ et al, 1997, 1998) e na urina (SALINA et al, 1998), vem sendo utilizada para fins diagnósticos (quando a detecção do anticorpo não é conclusiva), acompanhamento da doença e verificação da eficácia terapêutica (FREITAS DA SILVA et al, 1992). Técnicas de Biologia Molecular são as novas alternativas para o diagnóstico da PCM, e consistem na detecção de seqüências do fungo tanto em material clínico (GOMES et al, 2000), como em animais experimentais (GOLDANI e SUGAR, 1998).

Quando o fungo invade os tecidos, a interação dos antígenos liberados com o sistema imune do hospedeiro causa uma resposta celular ou humoral que tem importância fundamental no desenvolvimento da doença. Na PCM a resposta imune celular é considerada o principal mecanismo de defesa contra o parasita (PERAÇOLI et al, 1991; CANO et al, 1995), enquanto anticorpos específicos produzidos em grandes quantidades não conseguem conferir proteção à doença (BENARD et al, 2001).

O estudo da relação parasita-hospedeiro na PCM mostrou que mecanismos de defesa naturais como o sistema complemento, as células NK e a fagocitose realizada pelos macrófagos e neutrófilos, além do controle genético de resistência e suscetibilidade ao parasita, têm importante papel na defesa precoce contra o *P. brasiliensis* (FRANCO, 1987; KULLBERG e ANAISSIE, 1998; KURITA et al, 2000).

Camundongos inoculados com o *P. brasiliensis* constituem excelente modelo experimental para estudo da PCM, pois diferem quanto à resistência e suscetibilidade à infecção. Linhagens B10 são extremamente suscetíveis apresentando altas taxas de mortalidade, enquanto camundongos A/J e A/Sn apresentam maior resistência à doença (CANO et al, 1995, 1998; CALICH e KASHINO, 1998).

Animais sensíveis à infecção, produzem altos níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG1 e IgG2b específicos ao parasita (CALICH et al, 1994, 1998; CANO et al, 1995), de maneira semelhante à forma juvenil da doença humana, na qual predominam anticorpos IgG4 e IgE (BAIDA et al, 1999; MAMONI et al, 2002). As formas mais graves da doença levam a ativação policlonal de linfócitos B (CHEQUER-BOU-HABIB et al, 1989) e a depressão da imunidade mediada por células, com resposta de HTT e linfoproliferação a mitógenos diminuídas (CASTAÑEDA et al, 1988; ROBLES et al, 1990), semelhantes a anergia descrita na doença humana (MUSATTI et al, 1976; MOTA et al, 1985; BENARD et al, 1995). Além disso, apresentam ativação ineficiente de macrófagos com expressão transitória de antígenos classe II e níveis de antigenemia aumentados (GARCIA et al, 1994; CALICH et al, 1994; CANO et al, 1995).

Por outro lado, camundongos resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam imunidade celular eficiente com teste cutâneo de HTT positivo a antígenos do fungo. Nestes animais macrófagos são ativados de forma mais efetiva, inibindo a transformação dos conídios fúngicos em leveduras e conseguindo conter a infecção através da produção de peróxido de hidrogênio (CANO et al, 1998) e óxido nítrico (GONZÁLES et al, 2000).

Além disso, camundongos resistentes produzem baixos níveis de anticorpos específicos da classe IgG2a e IgG3 (KASHINO et al, 2000), similares a pacientes com a forma adulta da doença, que apresentam maiores quantidades de IgG1 e IgG2 (BAIDA et al, 1999; MAMONI et al, 2002).

Diferentes citocinas podem influenciar na produção de diferentes isotipos de anticorpos, modulando a resposta imune. Em camundongos o switch para a produção de IgG2a tem sido associado à presença de IFN- γ , assim como a IL-4 influencia a produção de IgG1 e o TGF- β controla a síntese de IgA e IgG2b (ESSER e RADBRUCH, 1990; FINKELMAN et al, 1990; BANCHERAU e ROSSET, 1992).

A resposta imune efetora é uma consequência da ativação preferencial das populações Th1 ou Th2. Em modelos experimentais de infecções fúngicas, o desenvolvimento da proteção está associado com o perfil de citocinas Th1, enquanto a presença de citocinas do tipo Th2 tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças crônicas mais graves (MOSMANN e COFFMAN, 1989; ROMANI et al, 1994). Essa dicotomia na produção de citocinas que preferencialmente aumentam a resposta imune celular ou humoral, tem ajudado a melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle de várias doenças infecciosas (O'GARRA, 1996).

A resposta protetora do tipo Th1 é dependente de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12, sendo esta considerada de maior importância na diferenciação desse tipo celular. Na PCM e em outras micoses sistêmicas como histoplasmose (ZHOU et al, 1995) e coccidioidomicose (MAGEE e COX, 1996), a produção de citocinas ativadoras de macrófagos é essencial para a defesa do hospedeiro.

A IL-12 é a principal citocina inflamatória produzida por células fagocíticas, linfócitos B e outras células apresentadoras de antígeno, modulando a resposta imune e fornecendo um elo importante entre resistência inata e adaptativa (TRINCHIERI, 1993; HINO et al, 2000). Uma das atividades fisiológicas mais importantes dessa citocina, é induzir a produção de IFN- γ por células T e NK (D' ANDREA et al, 1992) e aumentar a atividade citolítica dessas células e de macrófagos, contra vários patógenos intracelulares (TRINCHIERI, 1994; COHEN e COHEN, 1996).

ROMANO et al (2002) demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes com PCM aumentava a produção de IFN- γ , e quando adicionadas em culturas junto com anti-IL-10, aumentava também a resposta linfoproliferativa frente a antígenos do fungo. Na PCM murina, o efeito protetor da IL-12 está associado à diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10, citocinas do tipo Th2 (CALICH e KASHINO, 1998).

O IFN- γ estimula a produção de IL-12 e outras citocinas inflamatórias por células fagocíticas, participando de um mecanismo de retroação positivo, amplificando a resposta inflamatória nas infecções. É considerado o principal ativador de macrófagos (KULLBERG e ANAISSIE, 1998), estimulando a produção de TNF- α e a destruição intracelular do *P. brasiliensis* através de mecanismo não dependente de oxigênio (BRUMMER et al, 1988).

A administração de IFN- γ recombinante potencializa a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, impedindo o progresso da infecção (CANO et al, 1992), enquanto a neutralização dessa citocina induz a exacerbação da infecção pulmonar, a disseminação fúngica precoce para outros órgãos, a diminuição de resposta de HTT e o aumento nos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2b (CANO et al, 1998; ARRUDA et al, 2002). Estudo recente com células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM, demonstrou que a produção de IFN- γ está diminuída durante a doença ativa e pode ser restaurada pós-tratamento (KARHAWI et al, 2000).

ALMEIDA et al (1998) observaram que, em camundongos resistentes, antígenos de *P. brasiliensis* são preferencialmente apresentados por macrófagos, estimulando a produção de citocinas Th1, como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , associadas a baixa

quantidade de TGF- β . Estes achados são concordantes com CALICH e KASHINO (1998) e KASHINO et al (2000), que detectaram altos níveis de IFN- γ e IL-2 já no início da infecção experimental.

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos e macrófagos estimulados por endotoxinas ou ativada pelo IFN- γ , com o qual atua sinergisticamente. Estimula células T e os próprios macrófagos no combate à infecção, tem ação citotóxica para certas células tumorais e efeitos imunorregulatórios na ativação de PMN (MARTIN-OROZCO et al, 2001). O TNF- α aumenta a atividade fungicida de monócitos humanos estimulados com antígenos de parede celular do *P. brasiliensis* (ANJOS et al, 2002) e de macrófagos de hamsters infectados (PARISE-FORTES et al, 2000), limitando a disseminação fúngica.

Por outro lado, camundongos suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis* apresentam produção inicial de citocinas inibitórias como IL-5, IL-10 e TGF- β e baixa quantidade de IFN- γ , condições pouco favoráveis para uma resposta imune eficiente contra o fungo (CALICH e KASHINO, 1998; KASHINO et al, 2000). Nestes animais, a produção de grandes quantidades de IL-10 durante todo o curso da infecção sugere que a apresentação do antígeno seja feita via células B, que leva a uma forte ativação da subpopulação Th2, por meio da inibição da síntese de IL-12 (MASON, 1996; COHEN e COHEN, 1996; ALMEIDA, et al, 1998).

A IL-10 é uma citocina produzida por macrófagos, linfócitos Th2 e células B, que apresenta propriedades anti-inflamatórias, suprimindo a produção de IL-1, TNF- α e quimiocinas (DINARELLO, 2000; OPAL e DE PALO, 2000). Inibe várias funções de macrófagos como atividade microbicida, secreção de citocinas e apresentação de antígenos, pela diminuição da expressão de moléculas MHC classe II e de moléculas coestimulatórias (BOGDAN et al, 1991; OPAL e DE PALO, 2000).

Tem sido demonstrado que a IL-10 e o TGF- β atuam em conjunto na supressão da síntese de NO por macrófagos ativados, inibindo a capacidade microbicida dessas células (GAZINELLI et al, 1992; OSWALD et al, 1992). BENARD et al (2001) verificaram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM produzem altos níveis de IL-10, contrastando com menores níveis de IL-2 e IFN- γ .

Em trabalho anterior, nosso grupo verificou que pacientes com a forma juvenil da paracoccidiodomicose apresentam níveis séricos elevados de citocinas inibitórias da resposta celular como o TGF- β , além de anticorpos da classe IgG4 e IgE, sugerindo a participação da resposta Th2 nesta forma da doença (MAMONI et al, 2002). Este padrão também foi observado em pacientes com a forma adulta multifocal, nos quais a doença é mais grave e disseminada. Por outro lado, pacientes com a forma unifocal, cujo desenvolvimento é mais lento e benigno, produzem anticorpos da classe IgG1, não permitindo uma caracterização imunológica muito definida.

Além das formas clínicas já descritas, a PCM também pode ocorrer na forma de infecção, em indivíduos moradores da zona endêmica, caracterizada por teste cutâneo positivo a antígenos do fungo e ausência de sintomas da doença.

Na esquistossomose humana foi descrito o grupo normal endêmico, composto por indivíduos que moram na zona endêmica, têm contato freqüente com água contaminada, mas apresentam pesquisa de ovos de *S. mansoni* nas fezes repetidamente negativa. Estes indivíduos não desenvolvem a doença, embora tenham tido contato com o parasita, comprovado pela presença de anticorpos específicos no soro e resposta linfoproliferativa positiva a antígenos do verme (RUMBLEY et al, 1999). Por essas razões, alguns autores consideram que o grupo normal endêmico representa uma forma de resistência, assim como descrito na filariose (DAY, 1991), na qual uma eficiente resposta imune associada à produção de IFN- γ , provavelmente bloqueia o desenvolvimento da doença (VIANA et al, 1994).

A partir desses dados, foi nosso objetivo caracterizar o grupo PCM-infecção quanto à resposta imunológica, verificando se essa seria a forma de resistência da doença, em comparação aos pacientes com a forma adulta e juvenil. Os indivíduos com PCM-infecção foram selecionados na zona endêmica de Campinas, utilizando como ponto de partida o domicílio dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP, principalmente crianças, consideradas marcadores epidemiológicos.



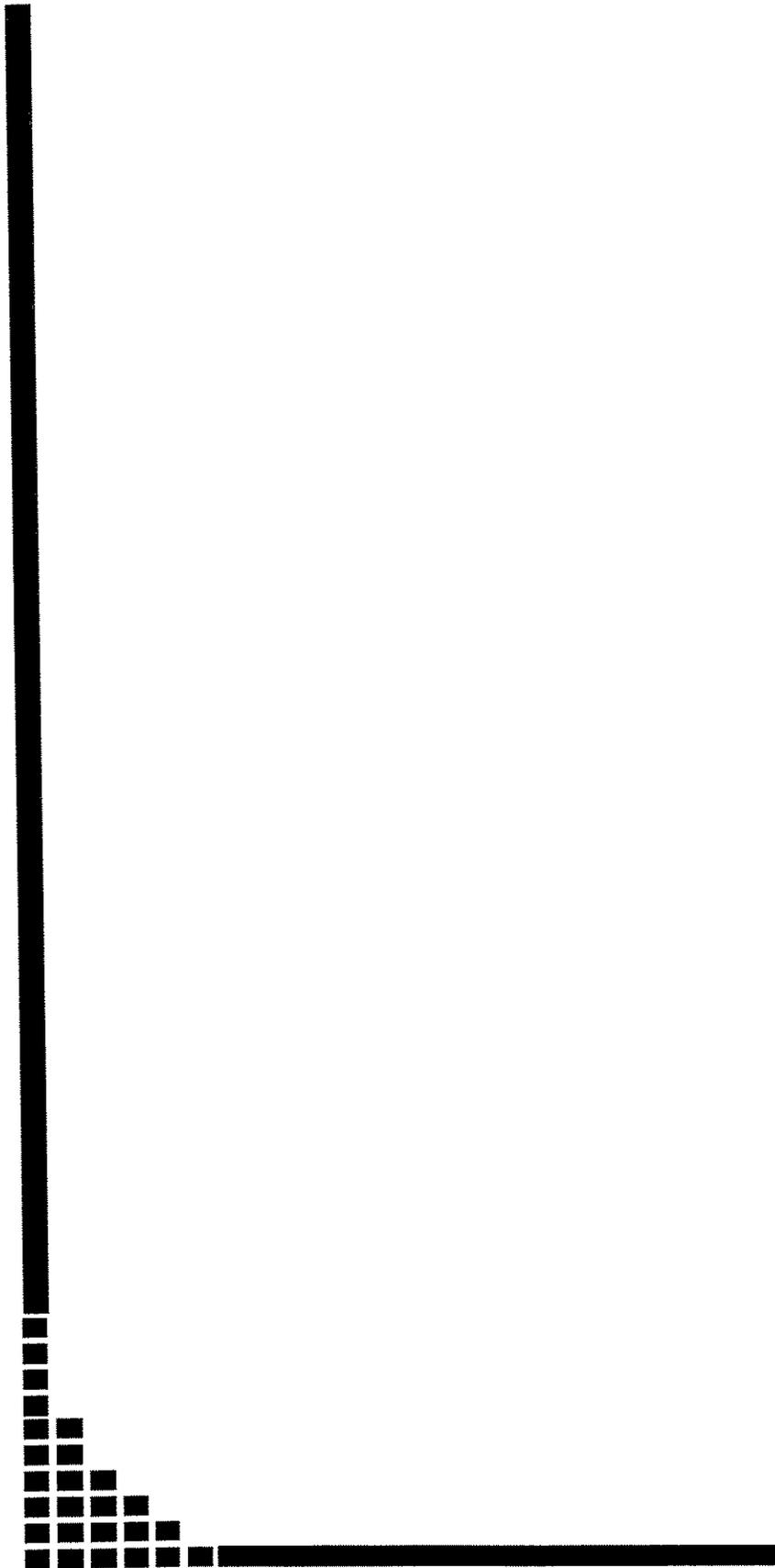
2- OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a epidemiologia e as características clínicas e imunológicas de pacientes com paracoccidiodomicose da região de Campinas. Em um primeiro estudo, foi analisado:

- as características gerais dos pacientes, como sexo, idade e ocupação principal;
- a incidência da doença na cidade de Campinas e região;
- os fatores de risco, sinais e formas clínicas da PCM.

A seguir, as características imunológicas da doença foram avaliadas comparando-se a resposta imune celular de pacientes com a forma aguda e crônica da paracoccidiodomicose, de indivíduos infectados que não desenvolveram a doença e controles normais saudáveis. Para tanto, foi estudado:

- o padrão de resposta linfoproliferativa aos antígenos do fungo e
- a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2.



3- ARTIGO I

ENDEMIC REGIONS OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN BRAZIL: A CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIC STUDY OF 584 CASES IN THE SOUTHEAST REGION

MARIA HELOISA S. L. BLOTTA, RONEI LUCIANO MAMONI, SARA JESUS OLIVEIRA, SIMONE A. NOUÉR, PRISCILA M. O. PAPAORDANOU, ALEXANDRE GOVEIA, AND ZOILO PIRES DE CAMARGO

Department of Clinical Pathology, and Department of Infectious Disease, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Abstract. This paper describes the clinical-seroepidemiologic characteristics of patients with paracoccidioidomycosis (PCM) who visited the University Hospital at the State University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil). The study group consisted of 584 individuals (492 males and 92 females) with ages ranging from 5 to 87 years. The highest incidence of the disease occurred between the ages of 41 and 50 years for men and between 11 and 40 years for women. Rural activities were the principal occupation of 46% of the patients. The diagnosis was confirmed by histopathologic examination and demonstration of fungus in scrapings, secretions, or in the sputum. Serologic test results for PCM were positive in 80% of the 584 patients studied. The significant number of patients, including 33 children less than 14 years old, indicates the presence of the fungus in the area and that this region is an important endemic area for PCM.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Almost all South and Central American countries have large regions where PCM is endemic, particularly in Brazil, Colombia, Venezuela, and Argentina. The disease has a limited geographic distribution from 23°N (southern Mexico) to 34.5°S (Argentina and Uruguay).¹ The endemic areas have mild temperatures (17–24°C), moderate rainfall (900–1,810 mm/year), abundant forests, numerous small rivers, and indigenous trees, and a short winter and rainy summer.²

This disease typically manifests between the third and sixth decades of life. Two main clinical forms of the disease are recognized by the International Committee for PCM,³ namely, an acute or subacute form and a unifocal or multifocal chronic form. The acute form affects young patients of both sexes and involves mainly the reticuloendothelial system, whereas the chronic form, is most prevalent in adult males and has a predominant pulmonary and/or mucocutaneous involvement.^{4,5} The higher frequency of the disease in men was initially attributed to their more intense exposure to the fungus' habitat (soil) through agricultural work. This disease is less frequent in females once they reach puberty because of the protective role of estrogen. This female hormone inhibits the transition of conidia-mycelial propagules to the yeast form, a critical step in the pathogenesis of the disease.^{6,7}

Since the reporting of PCM is not compulsory, it is difficult to establish the real prevalence of the disease. However, current data indicate a high incidence in Brazil, particularly in the State of São Paulo and the surrounding southern region, where there are various specialized health centers or hospitals.

Patients suspected of having a systemic mycosis are usually sent to general hospitals where they undergo a precise diagnosis and are advised about how to treat the condition. The University Hospital at the State University of Campinas (UH-UNICAMP), which is located in Campinas, a city of approximately 1 million inhabitants in São Paulo State, serves 5 million people throughout the region.

The gold standard for the diagnosis of PCM is the direct

visualization of characteristic multiple-budding cells in biological fluids and tissue sections, or isolation of the fungus from human specimens. Serologic tests generally provide results earlier than culture and histopathology and can be of great use in diagnosing of the disease. The most common test for this purpose is the immunodiffusion test (ID), which uses a standardized exoantigen (Ag7) prepared from a 7-day culture of *P. brasiliensis* B339 strain.⁸ The ID test with Ag7 has a sensitivity of 97.1% and is specific when used with a reference serum. However, the lack of a serologic response does not exclude PCM, particularly in immunocompromised patients.

This paper describes the clinical-seroepidemiologic characteristics of patients with PCM who visited UH-UNICAMP and indicates that the Campinas region is an important endemic area for PCM.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the University of Campinas Medical Science School Research Ethical Committee. Informed consent was not necessary because the study was retrospective and no personal identifiers were used.

Sera. Sera from patients suspected of having PCM were sent to the Clinical Pathology Laboratory at UH-UNICAMP for serologic analysis over a period of 8 years (1988–1996).

Antigen preparation. A lyophilized exoantigen was prepared from a yeast-form culture of *P. brasiliensis* B-339 as described previously.⁸ A peptone-rich medium supplemented with thiamine and asparagine was used. After a 7-day incubation, the cells were killed with merthiolate (0.2 g/L), left at 4°C overnight, and then filtered through filter paper. The crude filtrate was concentrated under vacuum at 45°C, dialyzed for 48 hr against distilled water, and lyophilized. This preparation is rich in gp43, the 43-kD glycoprotein that is the immunodominant and specific molecule for use in the immunodiffusion tests.⁹

Immunodiffusion. This assay was performed as described elsewhere.⁸ Briefly, a 3-ml portion of a 1% solution of agarose in phosphate-buffered saline was poured onto a glass slide (75 × 25 mm). The pattern for the microimmunodif-

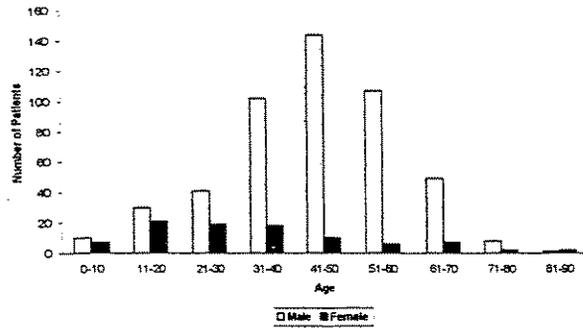


FIGURE 1. Distribution of patients with paracoccidioidomycosis according to sex and age (years).

fusion test consisted of a central well surrounded by six wells, each 3-mm in diameter. The central well was filled with 10 μ l of antigen, while the others received 10 μ l of serum. The slides were incubated overnight in a moist chamber at room temperature (20–25°C), washed for 1 hr in 5% sodium citrate and then for 24–48 hr in saline. The slides were subsequently dried, stained for 3–5 min with 0.15% Cornassie brilliant blue (Sigma, St. Louis, MO) in ethanol-acetic acid-water (4:2:4 [v/v]), and destained in this solvent mixture without dye whenever necessary. The slides were air-dried and the precipitin lines were recorded.

Clinical and epidemiologic data. The age, sex, area of residency, occupation, clinical forms of the disease, risk factors (alcoholism and tobacco smoking), chest radiographic findings, histopathologic findings, and the results of direct examination of clinical specimens were obtained from the medical records of each patient.

RESULTS

Epidemiological data. The study group consisted of 584 individuals (492 males and 92 females) with ages ranging from 5 to 87 years. The highest incidence of the disease occurred between the ages of 41 and 50 years for men and 11 and 40 years for women (Figure 1). The male:female ratio was 5.4:1. A predominance of males is characteristic of PCM, although the number of women in this particular group was high (16%) compared with other reports.¹⁰ Most of the patients (90%) lived in São Paulo State (Table 1), mainly in counties around Campinas (Table 2 and Figure 2).

Rural activities were the principal occupation of 46% of the patients, although only 120 subjects were actually involved with these activities when the symptoms appeared. The second main professional activity was bricklaying and masonry (Table 3).

Laboratory data. Serologic test results for PCM were positive in 80% of the 584 patients studied, with titers ranging from 1:2 to 1:4,096. The diagnosis was confirmed by histopathologic examination of tegumentary, ganglionic and pulmonary biopsies, and by demonstration of fungus in tegumentary lesions scrapings, lymph node secretions, or in the sputum (direct examination) (Table 4). For 20% of the patients, a positive serology was the only laboratory evidence of the disease and, together with clinical and epidemiologic findings compatible with PCM, was decisive for a

TABLE 1

Brazilian states from which the patients with paracoccidioidomycosis came

State	No. of patients	%
São Paulo	524	89.7
Minas Gerais	50	8.5
Rondônia	3	0.5
Mato Grosso	2	0.3
Bahia	1	0.2
Mato Grosso do Sul	1	0.2
Paraná	1	0.2
Pernambuco	1	0.2
Rio de Janeiro	1	0.2
Total	584	100

correct diagnosis. Radiographic results also contributed to the diagnosis in 14 patients. The patients with negative serology (20%) consisted of immunosuppressed subjects or individuals under treatment (7%) as well as patients with active disease (13%).

Clinical data. The main complaints that initially led the patients to seek medical help were oral ulceration, pain in the mouth and throat, coughing with expectoration, and dyspnea.

The patients were classified as having one of the two forms of the disease (acute or chronic). Mucosal involvement was predominant followed by pulmonary, ganglionic, and tegumentary complications in both the isolated and disseminated chronic forms (Table 5). Most (~80%) of the patients lost weight (up to 10–15 kg) during the course of the disease. Six women were pregnant during treatment for PCM and in one case the fungus was found in the placenta, but the child was not infected.¹¹ In young individuals (< 30 years old, 21%), the reticuloendothelial system was severely affected and the disease showed an acute course. The most relevant associated pathologies were tuberculosis, Addison's disease, cancer, and autoimmune diseases.

DISCUSSION

This study involved 584 patients with PCM who visited UH-UNICAMP. The male:female ratio of 5.4:1 was lower

TABLE 2

Residency of patients with paracoccidioidomycosis in São Paulo State, Brazil

Micro-regions	No. of patients	%
Campinas	251	47.9
São João da Boa Vista	62	11.9
Limeira	60	11.5
Jundiaí	43	8.1
Piracicaba	32	6.1
Sorocaba	31	5.9
Bragança Paulista	21	4
Rio Claro	13	2.4
São Carlos	4	0.8
Itapeva	2	0.4
Presidente Prudente	2	0.4
Lins	1	0.2
Araçatuba	1	0.2
Ribeirão Preto	1	0.2
Total	524	100

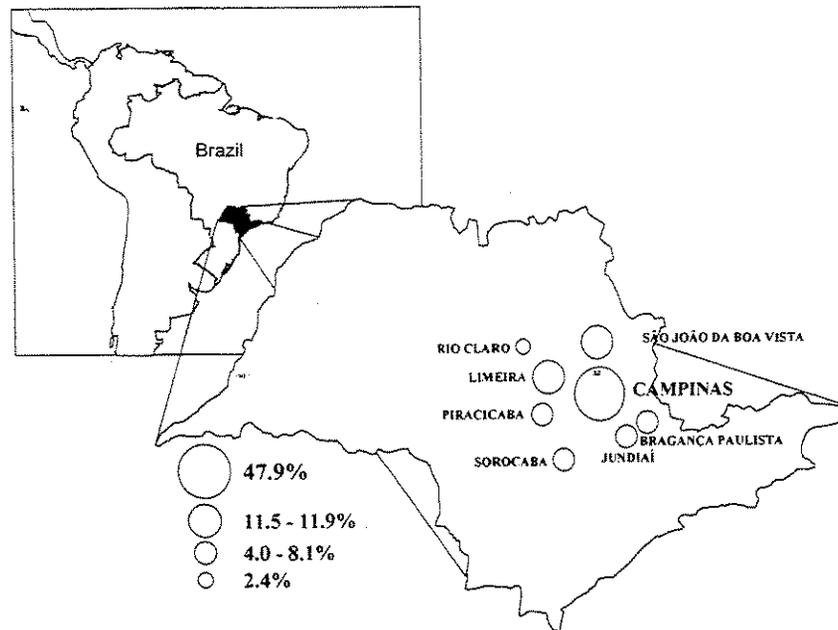


FIGURE 2. Residency of patients with paracoccidioidomycosis in São Paulo State (Brazil). The distribution of patients/area is expressed as a percentage of the total number of patients studied.

(thus, the number of females was higher) than in other studies in similar populations.^{12,13} Mota¹⁴ reported a male:female ratio of 6.5:1 in Paraná State (southern Brazil) and attributed this to the number of women working on coffee plantations in that region. In our group there was a higher number of women and children with PCM. Almost 40% of the women presented with the acute form, a more severe and many times disseminated version of the disease; this would explain their desire to attend a specialized hospital. The study groups included 33 children less than 14 years old, the youngest being a 5-year-old boy. Although the disease is uncommon in children, when the mycosis is taken into consideration in the differential diagnosis in endemic areas, cases of PCM in childhood are more frequently recognized. The young patients in our group showed frequent involvement of the lymph nodes and skin, in contrast to a low involvement of the oropharynx and lungs. In patients > 25 years old, mucosal and pulmonary involvement was preponderant, followed by tegumentary, ganglionic, and suprarenal complications, both in the isolated and disseminated forms. The

significant number of young people involved (98 patients less than 25 years old, 16%) is an indication of the presence of the fungus in the area studied. Children and young adults are considered epidemiologic markers since they have a restricted migratory profile.

The region of Campinas has acidic soil, long periods of rainfall (8 months), a tropical climate, agricultural areas, and planted pastures. The predominance of sugar cane, cotton and coffee plantations in the region favors contact between the rural worker and soil particles and plants, in which the fungus is found.

Several investigators have indicated that PCM is more prevalent among rural workers engaged in intensive agriculture.¹⁵⁻¹⁸ Most of the patients in our group stated that they have lived and worked in rural areas during some period of their lives. After moving to urban centers, they started new jobs, many of them working as bricklayers. It is possible that some infections may have occurred in the urban area during activities that involved contact with soil and wood. Apparently innocuous activities, such as gardening, may also

TABLE 3

Principal occupations among 584 patients with paracoccidioidomycosis

Occupation	Male		Female		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Agricultural work	241	49	28	30	269	46
Construction*	113	23	2	2	115	20
Industry	39	8	0	0	39	7
Others	99	20	62	68	161	27
Total	492	100	92	100	584	100

* Bricklaying, masonry.

TABLE 4

Methods used to diagnose paracoccidioidomycosis in 584 patients

Diagnosis established by	Serology	
	Positive	Negative
Biopsy*	241	71
Direct examination*	78	33
Biopsy plus direct examination*	23	10
Radiograph*	12	2
Only serology	114	0
Total	468	116

* Plus serology.

TABLE 5
Clinical forms of paracoccidioidomycosis among 584 patients

Clinical forms	Male		Female		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Acute unifocal	49	10	14	15	63	11
Acute multifocal	29	6	25	27	54	9
Chronic unifocal	143	29	21	23	164	28
Chronic multifocal	271	55	32	34	303	52
Total	492	100	92	100	584	100

give rise to the disease. In large cities, multiple construction and demolition projects occur simultaneously, and individuals exposed during such work may become infected.

Alcoholism and tobacco smoking were frequently associated with the disease among our patients. The role of alcohol as a risk factor favoring an immunologic imbalance and the reappearance of quiescent PCM has been reported for the progressive form of the disease (Andrade JAF, 1987. Avaliação da Frequência de Micose Sistêmicas e Oportunistas em Pacientes com Doenças Pulmonares: Estudo Clínico e Sorológico no Hospital Otávio Mangabeira. Masters Degree Thesis. State University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil).¹⁹

Many diseases must be considered in any differential diagnosis of PCM. Neoplasms (carcinoma and lymphoma), infections (tuberculosis and other fungi), noninfectious inflammation (sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis) and autoimmune diseases must be ruled out before a diagnosis of PCM is accepted. Serologic tests are of great importance as an aid in excluding these and other pathologies.

During the study period, there were situations in which the serology was negative but the fungus was detected in biopsy specimens or by direct examination. Some of these cases involved immunosuppressed patients (human immunodeficiency virus positive, cancer, and autoimmune disease) in whom the mycosis remained serologically undiagnosed. Patients at the end of their treatment may also have undetectable levels of specific antibodies. However, for some patients with confirmed active disease, the negative serology seems to be related to the inadequacy of the serologic test used. The diagnosis of such cases may be possible using antigens prepared from different strains of *P. brasiliensis* and new immunologic approaches.

In contrast to public hospitals in São Paulo, the individuals who visited UH-UNICAMP were mainly from neighboring counties. The towns involved are associated with the hospital since the latter provides many of them with tertiary medical care.

Since we studied a hospital population, the number of patients with PCM does not necessarily reflect the real incidence of the disease in the area. In particular, the mild forms of the disease are probably diagnosed and treated in health centers and small hospitals near the homes of patients. Some cases are likely to be missed because the disease frequently is not given medical attention. Thus, since specialized centers tend to treat only the severe forms of PCM, an analysis of such data may result in an erroneous epidemiologic profile. Nevertheless, considering the increased number of patients admitted to our hospital and the areas from which the patients come, we conclude that the region of Campinas is

an endemic zone for PCM. We have since initiated a detailed epidemiologic study of this region, with particular attention being paid to children with PCM since they serve as useful markers for the distribution of the disease.

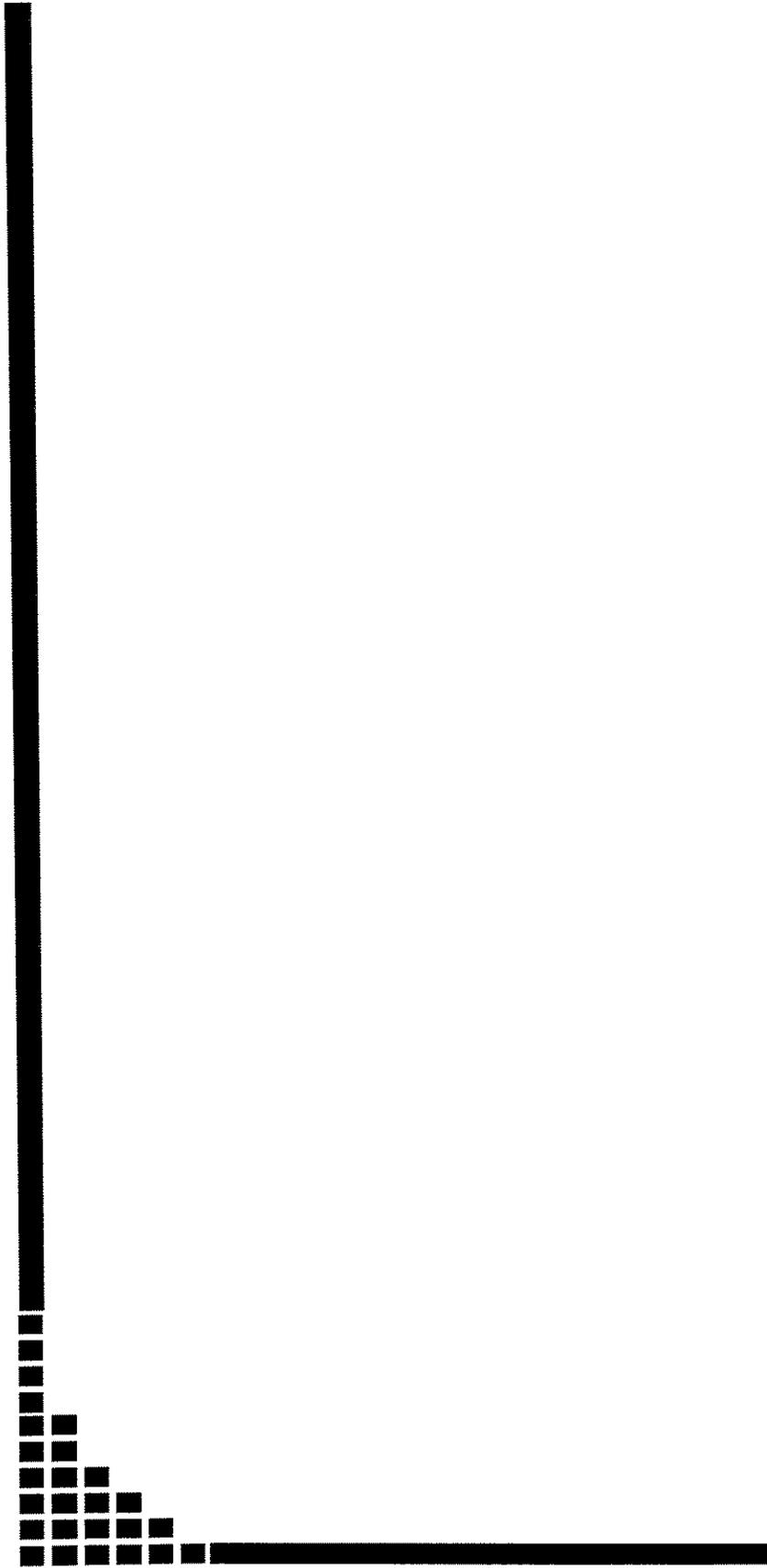
In conclusion, this study calls attention to PCM as a major public health problem in the Campinas region of Brazil. Although there are no control measures that may be applied to prevent the disease, efforts should include increasing awareness among clinicians and the public, especially people living in rural areas where PCM is endemic.

Authors' addresses: Maria Heloisa S. L. Blotta, Ronei Luciano Mamon, Sara Jesus Oliveira, and Alexandre Goveia, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. Simone A. Nouér and Priscila M. O. Papiordanou, Department of Infectious Disease, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. Zoilo Pires de Camargo, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

REFERENCES

- Negróni R, 1993. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int J Dermatol* 32: 847-885.
- Restrepo A, 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* 23: 323-334.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS, 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 129-132.
- Castro RM, Del Negro G, 1976. Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 31: 194-198.
- Mendes RP, 1994. The gamut of clinical manifestations. Franco, M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*, Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 233-259.
- Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA, 1984. Estrogens inhibit mycelium to yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of female paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 46: 346-353.
- Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA, 1988. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 56: 711-713.
- Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR, 1988. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol* 26: 2147-2151.
- Puccia R, Travassos LR, 1991. 43-kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol* 29: 1610-1615.
- Greer DL, Restrepo A, 1977. La epidemiología de la paracoccidioidomycosis. *Bol Oficina Sanit Panam* 83: 428-445.
- Blotta MHSL, Altemani AM, Amaral E, Silva LJ, Camargo ZP, 1993. Placental involvement in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 31: 249-257.
- Gonçalves AJR, Somogy LA, Braga MP, Pedrosa MC, Carvalho FG, Vieira ARM, Silva MISP, Matos HJ, 1984. Paracoccidioidomycose (blastomycose sul-americana). Experiência de um hospital geral. *Arg Bras Med* 58: 237-243.
- Londero AT, Ramos CD, 1972. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa-Maria, RS, Brazil. *Am J Med* 52: 771-775.
- Mota CCS, 1996. Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastomycose sul americana no Paraná. *An Fac Med Univ FedParaná* 9-10: 53-92.

15. Borelli D. 1970. Prevalence of systemic mycosis in Latin America. *Proceedings of the International Symposium on Mycoses*. Publication no. 205. Washington, DC: Pan American Health Organization, 28-38.
16. Marques SA, Franco M, Mendes RP, Silva NCA, Baccilli C, Curcelli ED, Ferracin ACM, Oliveira CS, Tagliarini JV, Dillon NL. 1983. Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo—Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 25: 87-92.
17. Lacaz CS, Porto E, Martins JEG. 1984. Paracoccidiodomicose. *Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico*. Eighth edition. São Paulo, Brazil: Sarvier Editora, 248-261.
18. Bethlem NM, Lemle A, Bethlem E, Wanke B. 1991. Paracoccidiodomycosis. *Semin Respir Med* 12: 8-97.
19. Martinez R, Moya MJ. 1992. The relationship between paracoccidiodomycosis and alcoholism. *Rev Saúde Pública* 26: 12-16.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4- ARTIGO II

Original article

Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls

Sara J. Oliveira ^a, Ronei L. Mamoni ^a, Chloé C. Musatti ^b, Priscilla M.O. Papaiordanou ^c,
Maria Heloisa S.L. Blotta ^{a,*}

^aDepartment of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP) Medical School, PO Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^bDepartment of Pathology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^cDepartment of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP) Medical School, Campinas, SP, Brazil

Received 25 June 2001; accepted 29 October 2001

First published online 25 January 2002

Abstract

Cellular immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* antigens (PbAg) was evaluated in patients with the juvenile (JF) and adult (AF) forms of paracoccidioidomycosis as well as in a group of infected individuals living in the endemic area but without any clinical manifestation of the disease. The immune profile of this group of paracoccidioidomycosis-infected individuals was characterized by: 1) a positive skin test to *P. brasiliensis* antigen; 2) absence of specific antibodies; 3) a vigorous lymphoproliferative response to PbAg; and 4) a typical Th1 pattern of cytokines, with production of IFN- γ and basal levels of IL-4, IL-5 and IL-10. At the opposite end of the spectrum were the JF patients whose proliferative response to PbAg was significantly impaired and whose cytokine pattern was characteristically Th2, i.e. lower IFN- γ secretion and significantly higher levels of IL-4, IL-5 and IL-10. These profiles are compatible with forms of higher and lower resistance, respectively. Intermediate immune responses were observed in AF patients, whose specific lymphoproliferative response was lower than in the paracoccidioidomycosis-infected group but higher than in the JF patients. The secretion of IFN- γ and IL-10 did not differ from the JF group, although IL-4 and IL-5 levels were significantly lower. Since AF patients are able to control fungal dissemination for decades, they can be considered more resistant than JF patients, who manifest the disease soon after infection. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; Th1, Th2; Cytokines

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an important cause of morbidity and mortality in rural areas of Latin America, especially in Brazil. Like other deep-seated mycoses, PCM occurs as an infection or as a disease [1,2]. Surveys with the paracoccidioidin skin test carried out in endemic areas have shown that individuals are first infected at an early age, with a peak of incidence between 15 and 19 years of age [3].

Differences among individuals in the patterns of immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* are important determinants of disease progression and clinical outcome. The great majority of PCM patients consist of previously healthy men aged 30 to 50 years. However, some individuals are especially susceptible to this fungal agent and show overt PCM around puberty or even in childhood.

The disease presents a broad spectrum of clinical and pathological manifestations ranging from benign and localized forms to severely disseminated disease. According to the current classification [4], paracoccidioidomycosis infection (PI) is defined as an asymptomatic infection caused by *P. brasiliensis* in healthy individuals who live in endemic

* Corresponding author. Tel.: +55-19-3788-9453; fax: +55-19-3788-9434.

E-mail address: heblotta@fcm.unicamp.br (M.H.S.L. Blotta).

areas and are positive to the paracoccidioidin skin test. The adult or chronic progressive form of the disease (AF) predominantly affects adult males, with a high frequency of pulmonary, skin, adrenal and visceral involvement. In clear contrast to the adult type, the juvenile type (JF) equally affects young patients of both sexes. The acute form is characterized by systemic lymph node involvement, hepatosplenomegaly, and bone marrow dysfunction, resembling a lymphoproliferative disease. Patients with AF usually exhibit low levels of specific antibodies and adequate cellular immune responses, while those with JF typically show high levels of specific antibodies, polyclonal activation of B cells, antigenemia, and impaired cellular immune responses.

Experimental data indicate that resistance to fungal infections relies on T cell, macrophage and B cell activities that are related to interferon- γ and other Th1 type cytokines [5]. On the other hand, susceptibility has been linked to the preferential production of cytokines of the Th2 type, i.e. IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10 [6]. Considering that the immunoglobulin isotypes are determined by the cytokine patterns, the detection of a particular isotype can be considered as an indicator of the corresponding pattern of inductive cytokines [7]. In a previous paper [8], we were able to show that JF patients present significantly higher titers of IgG4, IgE and IgA against the immunodominant and specific molecule of *P. brasiliensis* (gp43). These data, associated with eosinophilia, are strong evidence of a Th2 type of response in the juvenile form of PCM. In contrast, patients with the adult form were characterized by high levels of IgG1, lower levels of the other Ig isotypes, and lower number of eosinophils. In the present study we measured the proliferative response and cytokine production of lymphocytes from JF and AF patients in comparison with infected (PI) and non-infected controls.

2. Patients and methods

2.1. Patients

We enrolled 38 patients with newly diagnosed PCM attended to at the Clinical Hospital of UNICAMP. The diagnosis was established by fungus detection in clinical specimens and serology (immunodiffusion test). The patients were grouped according to clinical form: 14 with the juvenile acute form (JF, 10 males and 4 females, age: 8–24) and 24 with the chronic adult form (AF, 22 males and 2 females, age: 27–55) of the disease. We also analyzed 19 healthy paracoccidioidin-reactive (PI, 14 males and 5 females, age: 18–65) and 23 healthy paracoccidioidin-non-reactive (C, 15 males and 8 females, age: 27–55) individuals living in an endemic area for PCM (Campinas, SP, Brazil).

2.2. Antigen

P. brasiliensis B-339 yeast cells were grown in Neopeptone medium supplemented with thiamine and asparagine for 30 d and then killed with merthiolate (0.2 g/l). The preparation was filtered and the cells were homogenized and sonicated (3 cycles of 1 min each). The mixture was left shaking overnight and centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4 °C the next day. The supernatant was dialyzed against 0.02 M Tris-HCl, pH 8.1, for 24 h and the resulting supernatant fluid contained the antigen (PbAg). Protein concentration was determined by the method of Bradford [9].

2.3. Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction

Skin tests were performed on the left forearm by intradermal injection of 100 μ l of *P. brasiliensis* gp43 (7.5 μ g), and considered positive when an induration larger than 5 mm was observed after 24 h [10].

2.4. Culture conditions

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from patients and healthy adult donors and isolated over Ficoll-Hypaque. After washing three times with PBS, the mononuclear cells were incubated (2×10^6 cells/ml in 1640 RPMI supplemented with 10% AB serum, 2% L-glutamine and antibiotics) at 37 °C in a CO₂ incubator. The cells were cultured with PbAg for the assessment of proliferation and cytokine production.

2.5. Proliferation assay

PBMC (2×10^6 cells/ml) were cultured with PbAg (1 μ g/ml) for 5 d in 96-well plates. The cultures were then pulsed with [³H] thymidine (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England) (1 μ Ci/well), harvested 18–24 h later and counted using standard liquid scintillation counting techniques.

2.6. Cytokine quantitation

PBMC (2×10^6) were plated onto 24-well plates with or without PbAg (1 μ g/ml). The supernatants were collected 48 h later and assayed for cytokines. IL-4, IL-10 and IL-5 were quantified by in-house ELISA. The antibodies used to coat the 96-well plates were 8D4-8 (anti-IL-4, PharMingen, San Diego, CA, USA), JES3-19F1 (anti-IL-10, ATCC) and 18051D (anti-IL-5, PharMingen). Second-step biotinylated detection mAbs were 25D2 (anti-IL-4, PharMingen), JES3-12G8 (anti-IL-10, PharMingen), and 18522 (anti-IL-5 (PharMingen). The lower detection limits for the assays were 27 pg/ml for IL-4, and 39 pg/ml for IL-5 and IL-10. IFN- γ and IL-12 (p40 and p70) levels were determined by commercially available sandwich ELISA (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) according to the

manufacturer's instructions. The detection limits were 2 and 5 pg/ml, respectively.

2.7. Statistical analysis

AF and JF patients and normal infected (PI) and non-infected controls (C) were compared using the Kruskal–Wallis non-parametric test. The relationship between lymphoproliferative response to PbAg and skin test size was examined using Spearman's rank correlation coefficient. Significance was defined as $P \leq 0.05$.

3. Results

Analysis of the proliferative response to PbAg showed that PBMC from individuals with PCM–infection (PI) present the highest levels of proliferation, followed by patients with the AF of the disease. No statistical differences were found between JF patients and the control group (Fig. 1).

The cellular antigen (PbAg) used in PBMC cultures for both proliferative response and cytokine production was analyzed by SDS-PAGE, which showed the glycoprotein of 43,000 daltons (gp43) as the main component of the preparation (data not shown). gp43 is the immunodominant antigen of *P. brasiliensis*, recognized by 100% of sera of patients with PCM by immunoblotting assay [11,12]. Purified gp43 was employed for skin tests, and for the PI individuals, a positive correlation was observed between the diameter of the cutaneous reaction (DTH) and the proliferative response to the PbAg (Fig. 2).

To assess whether Th2 type cytokines play a role in the depressed lymphoproliferative response observed mainly in JF patients, we evaluated IL-4 and IL-5 production in culture supernatants from PBMC stimulated with PbAg. Increased levels of IL-4 and IL-5 were found in patients with the JF of PCM (Fig. 3A, B), while no differences were detected between the other groups.

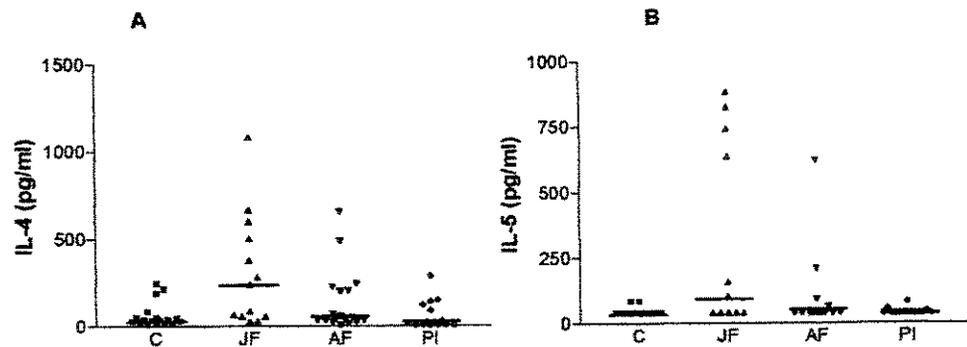


Fig. 3. Levels of IL-4 (A) and IL-5 (B) produced by PBMC from AF and JF patients and normal infected (PI) and non-infected controls (C) in response to PbAg. IL-4: C vs. JF, $P = 0.001$; JF vs. AF, $P = 0.04$; JF vs. PI, $P = 0.004$. IL-5: C vs. JF, $P < 0.0001$; JF vs. AF, $P = 0.006$; JF vs. PI, $P < 0.0001$. The horizontal bars represent the median.

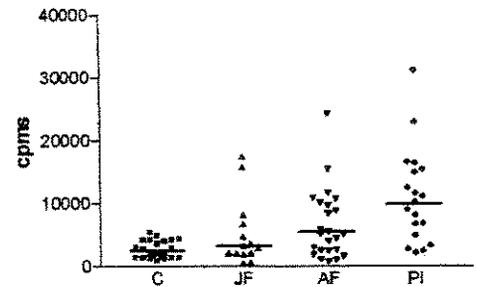


Fig. 1. Proliferative response of AF and JF patients and normal infected (PI) and non-infected controls (C) in response to PbAg. C vs. AF, $P = 0.006$; C vs. PI, $P < 0.0001$; JF vs. AF, $P = 0.03$; JF vs. PI, $P = 0.016$; AF vs. PI, $P = 0.02$. [^3H] thymidine incorporation by PBMC in the absence of PbAg was as follows: AF: 1870 ± 243 , JF: 1927 ± 122 , PI: 3847 ± 242 , C: 1794 ± 92 . The horizontal bars represent the median.

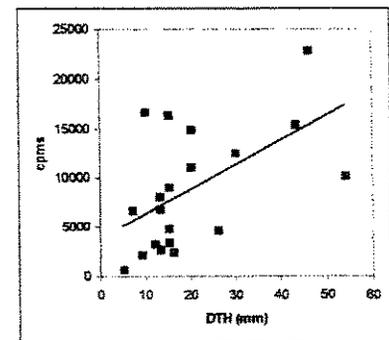


Fig. 2. Correlation between skin test diameter (DTH, mm) and proliferation (cpms). The antigens used were *P. brasiliensis* gp43 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for skin test and PbAg (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for proliferative assay. $R = 0.52$, $P = 0.02$.

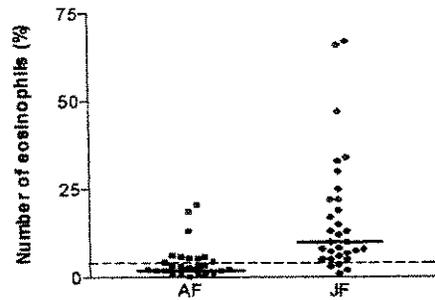


Fig. 4. Number (%) of peripheral blood eosinophils in AF and JF patients. Values below the dotted line are considered normal. JF vs. AF, $P < 0.0001$.

Considering the elevated concentration of IL-5 found in patients with the JF of PCM, their medical charts were analyzed regarding peripheral blood eosinophil counts. We also analyzed the charts of other patients with the JF ($n = 30$) and AF ($n = 30$) of PCM attending the UNICAMP Clinical Hospital in the last few years. The blood cell counts at the time of diagnosis showed significantly higher numbers of eosinophils in patients with the JF of the disease (Fig. 4).

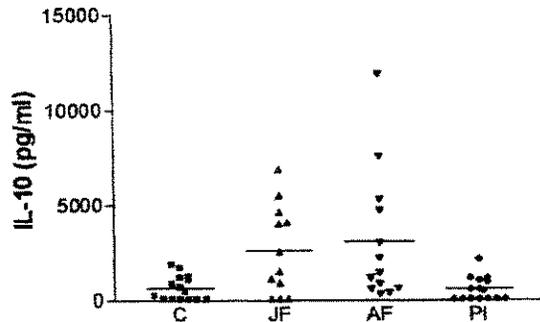


Fig. 5. Levels of IL-10 produced by PBMC from AF and JF patients and normal infected (PI) and non-infected controls (C) in response to PbAg. C vs. JF, $P = 0.03$; C vs. AF, $P = 0.009$; JF vs. PI, $P = 0.02$; AF vs. PI, $P = 0.004$. The horizontal bars represent the median.

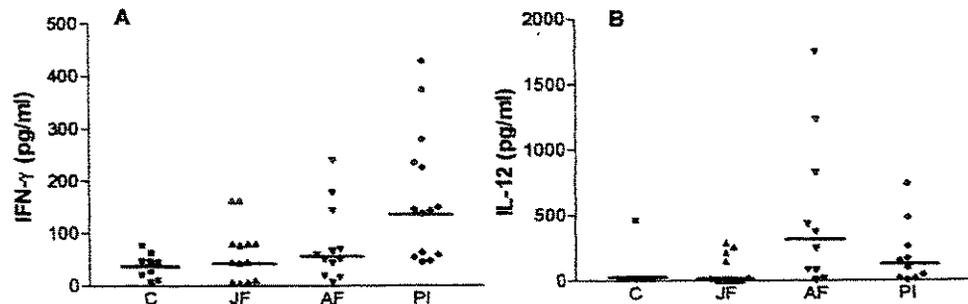


Fig. 6. Levels of IFN- γ (A) and IL-12 (B) produced by PBMC from AF and JF patients and normal infected (PI) and non-infected controls (C) in response to PbAg. IFN- γ : C vs. PI, $P = 0.003$; JF vs. PI, $P = 0.03$; AF vs. PI, $P = 0.04$. IL-12: C vs. AF, $P = 0.04$; JF vs. AF, $P = 0.03$. The horizontal bars represent the median.

No differences in IL-10 production were detected between JF and AF patients. However, the PI group produced significantly lower levels of this cytokine in response to antigen stimulation (Fig. 5). IFN- γ was produced more intensely in PBMC cultures from PI individuals (Fig. 6A), while no differences were observed between JF and AF patients. However, higher levels of IL-12 were observed in the supernatant of PBMC from AF patients, than in that of the JF and C groups (Fig. 6B).

Patients' and control subjects' cytokine levels in PBMC supernatants cultured in the absence of PbAg were below the detection limits indicated above (data not shown).

4. Discussion

Accumulated evidence in humans [13–16] and in experimentally infected animals [5,6,17,18] indicates that cell-mediated immunity is critical for host defense in PCM. In the present study the lymphoproliferative response and the cytokine production induced by *P. brasiliensis* antigens were investigated in the two clinical forms of PCM and compared with non-infected and infected healthy subjects.

PI is defined as a positive DTH reaction to fungus antigen in healthy individuals, who live or have lived in endemic areas [3,4]. The subjects included in this study presented reactions to gp43 ranging from 5 to 40 mm, positively correlated with the lymphoproliferative response to Pb antigens, but none of them produced specific antibodies (data not shown). This pattern of response is similar to that presented by an investigator accidentally infected with *P. brasiliensis* yeast cells while working in the laboratory [19]. This person developed a lesion in which the fungus was histologically detected and presented a 30-mm skin test in response to paracoccidioidin antigen. Serum antibodies, however, have never been detected and the investigator still remains free of signs or symptoms of the disease.

As expected for more resistant subjects, the pattern of cytokines produced by the PI group was typically Th1: undetectable levels of IL-4, IL-5 and IL-10, and IFN- γ

production higher than that of PCM patients and non-infected controls. This is the first time that such aspects have been investigated in a group of infected healthy subjects. The PI subjects never manifested symptoms of the disease and were selected among neighbors of children with PCM, considered as epidemiologic markers of the disease [20]. Others [16,17,21] have compared the immune response of patients with active disease to that of healthy persons who had PCM in the past and had been considered cured. These authors observed a clear impairment of the proliferative response to a Pb cell antigen in PCM patients before treatment compared with clinically cured controls [14]. In a subsequent paper, the results for the cell antigen of Pb were confirmed with gp43, although with lower levels of proliferation [15]. Our data clearly demonstrate that the lymphoproliferative response of JF patients to Pb antigens is significantly depressed in comparison to AF patients and PI subjects. This result is in accordance with previous work reporting impairment of IL-2 production [21] and decreased IL-2 receptor expression in PCM [13].

The juvenile acute form of PCM is supposed to occur soon after exposure to *P. brasiliensis* and is usually associated with uncontrolled fungal spread through the lymphatic system. Chronic adult disease is considered to be a reactivation of latent quiescent foci, occasionally stabilized for decades, thus presumably involving a strong, although temporary, effective immune response against the fungus [2–4]. In a previous study [8] we observed that patients with the juvenile form of PCM produced significantly higher levels of IgE, IgG4 and IgA anti-*P. brasiliensis* antibodies, indicating a Th2 profile of immune response. Accordingly, in the present study we were able to demonstrate, for the first time, that lymphocytes from patients with JF effectively produce significantly more IL-4 and IL-5, the two most representative of the Th2 pattern.

The main actions of IL-5 are to stimulate the growth and differentiation of eosinophils and to activate mature eosinophils [22]. The enhanced IL-5 production observed in JF is in accordance with the eosinophilia observed in the patients. These data complement previous studies by our group describing a strong correlation between the degree of eosinophilia and IgE antibody levels in JF of PCM [8], emphasizing two different characteristics of the Th2 profile.

Initially, we expected patients with the AF of PCM to produce lower levels of IL-4, IL-5, and IL-10, but higher levels of IFN- γ , when compared with JF patients. Our expectations were only partially validated, since no significant differences were observed regarding IL-10 and IFN- γ . There are two other recent studies directed at the investigation of cytokine production in human PCM, neither of which describes successful IL-4 or IL-5 determination [21,23]. These two independent groups observed that IFN- γ production was impaired in patients with active disease regardless of the clinical form, i.e. JF or AF. With respect to IL-10 production, however, they did not find any significant

difference between PCM patients and cured controls [21,23].

Our data confirm the observation that IL-10 is well preserved in PCM, regardless of the clinical form. However, a very intriguing difference can be observed when the IL-10 production of control groups is compared. The PI group included in the present study differed from healthy subjects with healed PCM by the fact that the former never manifested clinical symptoms of the disease, and by the significantly lower production of IL-10.

Experimental PCM studies with resistant (A/SN) and susceptible (B10.A) mice intraperitoneally infected with *P. brasiliensis* have shown that cytokine production varies during the course of the infection. An early secretion of high levels of TNF- α and IFN- γ followed by a sustained secretion of IL-2 and IFN- γ characterizes a Th1 pattern of response in resistant animals. In contrast, an early and ephemeral secretion of low levels of TNF- α and IFN- γ associated with production of IL-5, IL-10 and TGF- β , followed by a later IL-4 production, characterizes the Th2 pattern of susceptible animals. IL-10 was also produced by animals of a resistant strain, albeit later than the susceptible strain. The authors suggest that the delayed IL-10 production may have a role in reducing the production of type 1 cytokines, restraining their inflammatory effects on host tissues [5]. In another experimental PCM study, it was observed that when T cells from resistant mice were stimulated *in vitro* with B cells such as antigen-presenting cells (APC) from susceptible animals, very high levels of IL-10 were observed and vice-versa [24]. These results emphasize the importance of different T helper cell subsets in PCM infection and the reciprocal regulation between the innate and adaptive immune systems in the development of optimal anti-fungal immunity.

Several factors are known to regulate the Th1/Th2 cell decision. These include the genetic background, the type of APC interacting with a T cell and, most importantly, the cytokine milieu at the time of activation. Many *in vivo* and *in vitro* experiments have established a clear role for IL-4 in driving Th2 differentiation and inhibiting development of T cells, whilst IL-12 induces production of Th1 cells at the expense of Th2 cells (reviewed by Romagnani). Among its multiple activities, IL-12 is a potent inducer of IFN- γ from T and natural killer cells. As such, it is critical for the development of Th1 responses, leading to macrophage activation and the production of complement-fixing antibodies. Altogether, the axis formed between IL-12 and IFN- γ is essential for granuloma development and protective immunity against various intracellular microorganisms in mice and humans [25,26].

In the present study we observed lower levels of IFN- γ secretion in active PCM compared to healthy PI subjects. Against our prediction of a Th1 profile in AF, we did not detect any significant difference between AF and JF of PCM concerning IFN- γ production. Knowing that IL-12 is produced mainly by APC, macrophages and neutrophils [25]

we decided to measure IL-12 (p40 and p70) contents in the supernatant of PBMC cultures. In this case, it was possible to detect a significantly higher production by cells of AF than JF of PCM. These results, however, may be reflecting the constitutive secretion of p40 more than the biologically active p70, and require further confirmation.

In conclusion, this study confirmed our previous findings [8] that the JF is the Th2 pole of PCM, characterized by the production of IL-4, IL-5 and IL-10. These mediators associated with low IFN- γ and lymphocyte proliferation levels could result in a depressed cellular immune response and a severe manifestation of the disease. On the other hand, the PI individuals might represent the opposite pole, in which high IFN- γ production parallels with lymphocyte proliferation, in addition to very low levels of IL-10. This Th1 profile could lead to the development of an efficient immune response able to prevent the development of the disease. In this context, the AF would represent the intermediate pattern of immune response in PCM, situated between the Th2 and Th1 response showed by the JF and PI subjects, respectively.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] M.H.S.L. Blotta, R.L. Mamoni, S.J. Oliveira, S.A. Nouér, P.M.O. Paaiordanou, G. Gouveia, Z.P. Camargo, Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in southeast region, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61 (1999) 390–394.
- [2] G. Del Negro, C.S. Lacaz, V.A. Zamith, A.M. Siqueira, General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood, in: M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 225–232.
- [3] B. Wanke, A.T. Londero, Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection, in: M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 109–120.
- [4] M. Franco, M.R. Montenegro, R.P. Mendes, S.A. Marques, N.L. Dillon, N.G.S. Mota, Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20 (1987) 129–132.
- [5] V.L. Calich, S.S. Kashino, Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 615–623.
- [6] L.E. Cano, S.S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C.F. Xidieh, L.M. Singer-Vermees, C.A. Vaz, E. Burger, V.L. Calich, Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis, *Infect. Immun.* 66 (1998) 800–806.
- [7] S. Romagnani, T-cell subsets (Th1 versus Th2), *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85 (2000) 9–21.
- [8] R.L. Mamoni, S.A. Nouér, S.J. Oliveira, C.C. Musatti, C.L. Rossi, Z.P. Camargo, M.H.S.L. Blotta, Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis, *Med. Mycol.* (in press).
- [9] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [10] E.C.O. Saraiva, A. Altamiani, M.F. Franco, C.S. Unterkircher, Camargo Z.P., *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin, *J. Med. Vet. Mycol.* 34 (1996) 155–161.
- [11] M.H.S.L. Blotta, Z.P. Camargo, Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 671–676.
- [12] Z.P. Camargo, C. Unterkircher, L.R. Travassos, Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting, *J. Med. Vet. Mycol.* 27 (1989) 407–412.
- [13] C.C. Musatti, M.T.S. Peraçoli, A.M.V.C. Soares, M.T. Reskallah-Iwasso, Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis, in: M. Franco, C.S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 175–186.
- [14] G. Benard, M.A. Hong, G.M.B. Del Negro, L. Batista, M.A. Shikanai-Yasuda, A.J.S. Duarte, Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (1996) 7–13.
- [15] G. Benard, M.J.S. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E.T. Miranda, A.J.S. Duarte, Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response, *J. Inf. Dis.* 175 (1997) 1263–1267.
- [16] H. Baida, P.J.C. Biselli, M. Juvenale, G.M.B. Del Negro, M.J.S. Mendes-Giannini, A.J.S. Duarte, G. Benard, Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis, *Microbes Infect.* 1 (1999) 273–278.
- [17] J.S. Hostetler, E. Brummer, R.L. Coffman, D.A. Stevens, Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and an antifungal triazole (SCH42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with the outcome, *Clin. Exp. Immunol.* 94 (1993) 11–16.
- [18] J.T. Souto, F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M.A. Rossi, J.S. Silva, Interferon-gamma and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1811–1820.
- [19] C.C. Musatti, M.T. Reskallah, E. Mendes, N.F. Mendes, In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis, *Cell. Immunol.* 24 (1976) 365–378.
- [20] D. Cadavid, A. Restrepo, Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia, *Epidem. Infect.* 111 (1993) 121–133.
- [21] G. Benard, C.C. Romano, C.R. Caceres, M. Juvenale, M.J.S. Mendes-Giannini, A.J.S. Duarte, Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis, *Cytokine* 13 (2001) 248–252.
- [22] E.N.T. Meeusen, A. Balic, Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol. Today* 16 (2000) 95–101.
- [23] A.S.K. Karhawi, A.L. Colombo, R. Salomão, Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission, *Med. Mycol.* 38 (2000) 225–229.
- [24] S.R. Almeida, J.Z. Moraes, Z.P. Camargo, J. Gesztesi, M. Mariano, J.D. Lopes, Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells, *Cell. Immunol.* 190 (1998) 68–76.
- [25] L. Romani, The T cell response against fungal infections, *Curr. Opin. Immunol.* 9 (1997) 484–490.
- [26] M.K. Gately, L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, D. Presky, The interleukin-12/interleukin-12 receptor system: role in normal and pathologic immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 495–521.



5- DISCUSSÃO

O estudo epidemiológico de 584 pacientes com paracoccidiodomicose atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, mostrou uma relação homens: mulheres de 5,4:1, bem mais baixa que a maioria dos relatos epidemiológicos descritos na literatura. Em áreas de alta prevalência a doença ocorre mais freqüentemente em homens adultos, numa proporção de 13 homens para uma mulher (BRUMMER et al, 1993; LACAZ et al, 2002), podendo variar dependendo da região estudada (BORELLI, 1970; LONDERO e RAMOS, 1972; GONÇALVES et al, 1984).

Em estudos realizados na cidade de Botucatu (SP), área endêmica para a doença, MARQUES et al (1983) encontraram uma relação de pacientes masculino: feminino de 10,7:1, com maior freqüência entre trabalhadores rurais e da construção civil. Em Curitiba, TELLES FILHO et al (1986) observaram uma relação de 9,1:1, sendo que 78% desses indivíduos tinham atividades relacionadas à agricultura. Já em 1996, MOTA encontrou uma relação de 6,5 homens para 1 mulher no Estado do Paraná, o que atribuiu a marcante presença da mão de obra feminina nas plantações de café da região.

Em nosso trabalho, encontramos a maior incidência da doença na faixa etária de 41 a 50 anos para indivíduos do sexo masculino, e de 11 a 40 anos para o sexo feminino, pessoas cuja ocupação principal estava relacionada a atividades rurais seguida de atuação na construção civil.

A região de Campinas apresenta extensas áreas de agricultura com predomínio de cana-de-açúcar, algodão e café, favorecendo o contato entre trabalhadores rurais e partículas de solo e plantas, nas quais o fungo pode ser encontrado. BAUMGARDNER et al (1995), relataram que não há uma época propícia no ano para a infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, mas o fator importante talvez seja a perturbação do microambiente em que o fungo vive, como as escavações feitas em terraplanagens, com derrubada de árvores e preparação dos campos para o plantio.

A hipótese de o fungo habitar locais agrícolas, principalmente de culturas de café, sugere que estas plantações poderiam proporcionar condições de solo mais estáveis ao seu desenvolvimento. Este tipo de cultura exige cuidados constantes do agricultor e assim a infecção do hospedeiro seria facilitada pela grande quantidade de partículas que ficam em suspensão no ar, no período da colheita (ONO, 2000).

Diferentemente dos estudos realizados em hospitais públicos de São Paulo, nos quais a maioria dos pacientes era proveniente de outros Estados, os indivíduos atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP eram em grande parte, procedentes de cidades vizinhas. Por tratar-se de uma população hospitalar, o número de pacientes com a doença não reflete a real incidência e gravidade da PCM na região. De fato, os doentes encaminhados para esse hospital constituem provavelmente formas mais graves e de difícil tratamento, ficando as formas leves da doença, restritas aos centros de saúde locais ou hospitais menores da região.

O estudo sorológico mostrou que 80% dos pacientes apresentavam anticorpos contra o *P. brasiliensis*, com títulos que variavam de 1:2 a 1:4.096. Esse diagnóstico foi confirmado pelo exame histopatológico e/ou micológico direto. Apesar do achado do fungo ser considerado o padrão-ouro no diagnóstico da PCM, em 20% desses pacientes a sorologia positiva foi a única evidência laboratorial da doença, e junto com dados clínicos e epidemiológicos compatíveis, foi decisiva para o diagnóstico.

Por outro lado, nossos dados revelaram que 20% dos pacientes tinham sorologia negativa, embora com doença comprovada pelo exame micológico. Analisando melhor esse grupo verificamos que parte dele (7%) era composta por indivíduos imunossuprimidos (HIV positivos ou sob tratamento imunossupressor) ou pacientes em fase final de tratamento, o que justificaria o teste de imunodifusão negativo. Entretanto, também foram detectados pacientes com doença ativa e sorologia negativa (13%), motivo de estudo complementar, no qual se concluiu que a falta de reatividade em testes de imunodifusão pode ser relacionada à presença de anticorpos da subclasse IgG2, de baixa afinidade (NEVES et al, 2003).

Outra característica importante do grupo estudado foi o alto índice de tabagismo e etilismo, principalmente entre pacientes do sexo masculino. Estudos clínicos mostraram que o alcoolismo e o tabagismo são fatores de risco para a doença, pois favorecem um desbalanço imunológico que pode levar a reativação de focos quiescentes da PCM (ANDRADE, 1987; MARTINEZ e MOYA, 1992).

No grupo estudado a forma predominante da doença foi a crônica multifocal, com maior comprometimento de mucosas. Por outro lado, confirmou-se o envolvimento do sistema fagocítico-mononuclear em adultos jovens e crianças com a forma aguda da paracoccidioidomicose.

A casuística do HC da UNICAMP mostrou um número elevado de mulheres e crianças com PCM, sendo que quase 40% desses pacientes apresentavam a forma juvenil da doença, conhecidamente mais grave e disseminada. Esses doentes mostraram maior envolvimento de linfonodos e pele, em contraste com aqueles com a forma adulta, cujas complicações pulmonares e de mucosas foram predominantes. Embora a PCM não seja comum em crianças, no período estudado foram atendidos 33 pacientes menores de 14 anos, mostrando tratar-se de uma área de alta endemicidade e indicando possível presença do fungo na região.

Crianças e adultos jovens podem ser considerados marcadores epidemiológicos da doença, por apresentarem perfil migratório restrito (CADAVID e RESTREPO, 1993). Com base neste fato, realizamos um inquérito epidemiológico na região de Campinas, utilizando como ponto de partida o domicílio das crianças com PCM. Várias pessoas, incluindo vizinhos e parentes dos pacientes foram submetidos ao teste cutâneo de HTT com a gp43 do *P. brasiliensis*. Ao final desse estudo foi possível obter um grupo de indivíduos sadios, moradores da área endêmica que apresentavam resposta cutânea positiva ao antígeno do fungo, ao qual denominamos grupo PCM-infecção (PI).

Doenças agudas e crônicas podem resultar de processos imunológicos distintos. A PCM juvenil supostamente ocorre logo após a exposição ao parasita, quando se dá a disseminação fúngica através do sistema linfático. A doença crônica é considerada uma reativação de um foco latente, às vezes estabilizado por anos, supondo uma resposta imune temporária contra o fungo (FRANCO et al, 1987; DEL NEGRO et al, 1994; WANKE e LONDERO, 1994).

Dando continuidade ao estudo da resposta imune nas formas juvenil e adulta da PCM, incluímos o grupo PCM-infecção, além dos controles saudáveis que apresentavam teste cutâneo negativo.

Nossos resultados mostraram maiores níveis de resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo nos indivíduos do grupo PCM-infecção, seguido dos pacientes com a FA da PCM. Por outro lado, pacientes com a FJ apresentaram níveis bem menores, comparáveis ao grupo controle. A depressão da resposta linfoproliferativa a mitógenos e antígenos do fungo foi descrita na PCM humana e em modelos experimentais (BENARD et al, 195; SILVA et al, 1995; CALICH et al, 1998; SOUTO et al, 2000), sendo essa imunossupressão mais severa na forma aguda da doença.

Outros autores observaram uma diminuição na resposta linfoproliferativa específica em pacientes com a doença ativa, quando comparados a controles clinicamente curados (HOSTETLER et al, 1993; BENARD et al, 1996; BAIDA et al, 1999; BENARD et al, 2001).

Os indivíduos PCM-infecção apresentaram teste cutâneo positivo à gp43 de *P. brasiliensis*, com diâmetro variando de 5 a 40 mm, valores que se correlacionaram positivamente com a resposta linfoproliferativa ao antígeno. A pesquisa de anticorpos nestes indivíduos foi negativa. Padrão de resposta semelhante foi observado em um pesquisador infectado acidentalmente com o *P. brasiliensis*, durante trabalho em laboratório. Além do desenvolvimento de lesão histologicamente positiva para *P. brasiliensis*, o indivíduo apresentou reação cutânea de HTT de 30 mm de diâmetro, ausência de anticorpos e de qualquer sinal ou sintoma da doença (MUSATTI et al, 1976).

A produção de IL-2 em indivíduos com PCM-infecção, em culturas estimuladas com PHA, foi maior do que nos pacientes com a forma adulta ou juvenil da doença. Com estímulo antigênico não encontramos diferença significativa entre os grupos estudados, embora alguns indivíduos PCM-infecção apresentassem altos níveis desta citocina (apêndice, figura 1). Esses dados estão de acordo com estudos prévios que mostraram diminuição na produção de IL-2 (BENARD et al, 2001) e na expressão de seus receptores (RESKALLAH-IWASSO et al, 1989; MUSATTI et al, 1994) em pacientes com a doença em atividade, comparados com indivíduos curados.

Diferentes subpopulações de células T são conhecidas como estimuladoras de distintos padrões de resposta imune. Na candidíase experimental, a resposta de produção de citocinas do tipo Th1 foi associada à resistência adquirida à infecção (ROMANI et al, 1991), enquanto doença disseminada e fatal foi relacionada à resposta Th2 (ROMANI et al, 1992).

Vários fatores são conhecidos por regular a decisão da resposta Th1/Th2, incluindo a carga genética do hospedeiro, o tipo de interação entre células T e células apresentadoras de antígenos e a presença de citocinas na hora da ativação celular. Muitos experimentos in vitro definiram papel importante para IL-4 em direcionar a diferenciação celular para Th2, enquanto a IL-12 induz a produção de células Th1 (TRINCHIERI, 1993; ROMAGNANI, 1995, 2000).

O padrão de citocinas produzidas durante a resposta imune influencia de forma importante o desenvolvimento da doença, com a IL-4 e a IL-10 contribuindo para a disseminação e progressão (SCOTT e KAUFMANN, 1991) e a IL-2 e o IFN- γ participando da contenção da doença e recuperação do hospedeiro.

Como esperado para indivíduos resistentes à doença, o padrão de citocinas produzido pelo grupo PCM-infecção foi tipicamente Th1, com níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 e com maior produção de IFN- γ do que pacientes com PCM ou por controles saudáveis.

Em estudo prévio (MAMONI et al, 2002) observamos que pacientes com a FJ produziram altos níveis de anticorpos das classes IgA, IgE e IgG4 anti-*P. brasiliensis*, revelando um perfil Th2 de resposta imune. Confirmando esses dados, o presente estudo demonstrou que linfócitos desses pacientes (FJ) produziram maiores níveis de IL-4 e IL-5, citocinas representativas do padrão Th2. A produção aumentada dessas citocinas também foi observada por MELLO et al (2002), em pacientes com a forma ativa da PCM.

A IL-4 é considerada o principal estímulo para a produção de IgE, além de inibir a produção de IFN- γ e a consequente ativação de macrófagos, favorecendo a sobrevivência do patógeno e provavelmente a pior evolução dos pacientes com a forma juvenil da doença.

A principal atividade biológica da IL-5 é estimular a proliferação e diferenciação de eosinófilos (MEEUSEN e BALIC, 2000). A produção aumentada de IL-5 observada na forma juvenil da PCM justifica a eosinofilia encontrada, complementando dados anteriores que mostraram uma forte correlação entre o grau de eosinofilia e os níveis de IgE, evidenciando duas características distintas do perfil Th2 (MAMONI et al, 2002). Nesse estudo, o acompanhamento dos pacientes permitiu observar que níveis de IgE diminuíram gradativamente durante o tratamento, em paralelo com a diminuição significativa do número de eosinófilos na circulação, de acordo com as observações de BENARD et al (1996, 1997).

Em trabalho adicional verificamos que na FJ da PCM também se observa um número elevado de eosinófilos em biópsias de lesões de mucosa oral e linfonodos (apêndice, figura 2), (OLIVEIRA et al, 1999).

Outros investigadores também detectaram eosinofilia no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com a FJ da PCM (SHIKANAI-YASUDA et al, 1992; BENARD et al, 1994; RIOS-GONÇALVES et al, 1997), indicando doença grave e em atividade. WAGNER et al (1998) observaram deposição extracelular de proteína básica eosinofílica (MBP) em biópsias de granulomas de pacientes com PCM, sugerindo que os eosinófilos participam ativamente na fisiopatologia da doença.

O papel dos eosinófilos na resposta de defesa a helmintos está bem estabelecido. Na esquistosomose, parecem ser a principal fonte de IL-4 nos granulomas, influenciando na mudança da resposta Th1 para Th2 durante o curso da doença (RUMBLEY et al, 1999). Em infecções fúngicas, entretanto, a ação destas células não está bem esclarecida, mas, como produzem um grande número de proteases, peroxidases, histaminas, etc, poderiam atuar como moduladores da resposta inflamatória ao fungo.

Inicialmente esperávamos que pacientes com a forma adulta da PCM produzissem menores níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, com níveis elevados de IFN- γ , quando comparados com a forma juvenil. A hipótese se confirmou em relação a IL-4 e IL-5, entretanto, não foram observadas diferenças significativas quanto a produção de IL-10 e IFN- γ . Outros autores descreveram produção diminuída de IFN- γ em pacientes com PCM, e

com relação à produção de IL-10, não viram diferenças significativas entre indivíduos doentes e controles curados (KARHAWI et al, 2000; BENARD et al, 2001).

Nossos dados confirmam as observações que a produção de IL-10 está preservada na doença, independente da forma clínica. Entretanto, diferenças podem ser observadas em relação ao grupo PCM-infecção, que produziram níveis mínimos dessa citocina. Nossa hipótese é que a ausência ou a produção mínima de IL-10 induzida por antígenos de *P. brasiliensis* em indivíduos com PCM-infecção pode ser determinante no direcionamento da resposta para Th1, resultando em uma eficiente resposta protetora contra o fungo.

Em outro estudo no qual analisamos a resposta imune local em biópsias de linfonodos de pacientes com a FJ e de mucosa oral em pacientes com a FA da PCM, detectamos número significativamente maior de macrófagos, células epitelióides e células gigantes expressando IL-10 e TGF- β em linfonodos, quando comparamos à mucosa oral (NEWORAL et al, 2003). A presença marcante de citocinas supressoras em associação com elevado número de leveduras de *P. brasiliensis* em lesões da FJ da doença sugere um comprometimento da resposta imune do hospedeiro facilitando a disseminação do fungo.

Em estudo experimental, ALMEIDA et al (1998) observaram que células T de camundongos estimuladas in vitro com linfócitos B de animais sensíveis (como APC), produzem altos níveis de IL-10. Essa citocina foi originalmente descrita como Th2, com potente ação inibidora sobre células Th1 e macrófagos (MOSMANN, 1994). Estudos recentes têm colocado a IL-10 como fator de diferenciação para células T regulatórias (Tr1) da resposta imune, as quais produzem dez vezes mais IL-10 que os linfócitos Th2 (GROUX e POWRIE, 1999).

A suscetibilidade à infecção pulmonar na PCM experimental está associada a mecanismos imunes que levam a disseminação fúngica pela ineficiente fagocitose de macrófagos, baixa resposta de HTT e produção de anticorpos IgG específicos, atividades tipicamente influenciadas por células Th2. Camundongos resistentes desenvolvem uma resposta associada com ativação de células T, macrófagos e linfócitos B, mediados por IFN- (CANO et al, 1998).

Estudos em camundongos resistentes e suscetíveis à doença, infectados intraperitonealmente com *P. brasiliensis*, mostraram produção variável de citocinas durante o curso da infecção. A produção precoce de altos níveis de TNF- α e IFN- γ seguido de IL-2, caracterizaram o padrão Th1 de resposta imune nos animais resistentes (A/Sn). Ao contrário, produção inicial e transitória de baixos níveis de TNF- α e IFN- γ associados a produção de IL-5, IL-10 e TGF- β e produção tardia de IL-4, caracterizou o padrão Th2 em animais sensíveis (B10A). A IL-10 também foi produzida por cepas de camundongos resistentes, embora de forma mais tardia que pela cepa suscetível. Os autores (CALICH e KASHINO, 1998) sugerem que a produção tardia de IL-10 pode ter um papel importante na liberação de citocinas do tipo 1, reprimindo os efeitos inflamatórios nos tecidos do hospedeiro.

No presente trabalho observamos níveis mais elevados de IFN- γ nos indivíduos com PCM-infecção, caracterizando o perfil de resposta imune Th1 neste grupo. Entretanto, não detectamos diferenças significativas nos níveis de IFN- γ entre os pacientes com as formas adulta e juvenil da doença. O papel do IFN- γ na PCM está melhor definido na infecção experimental. A depleção de IFN- γ tanto em camundongos resistentes como suscetíveis exacerba a infecção pulmonar levando a disseminação precoce do fungo para vários tecidos. Estes achados foram confirmados em estudos com camundongos knock-out para IFN- γ (CANO et al, 1998; SOUTO et al, 2000; DEEPE et al, 2000).

Atuando de modo sinérgico ao IFN- γ , o TNF- α estimula macrófagos e células T, sendo essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares. Em estudo complementar (apêndice, figura 3) observamos que o grupo com PCM-infecção produz níveis elevados de TNF- α em resposta a estimulação com antígenos do fungo e mitógeno (PHA). Avaliando a resposta específica aos antígenos do fungo, pacientes com a forma adulta e grupo PCM-infecção respondem similarmente, produzindo níveis bem maiores de TNF- α do que pacientes com a forma juvenil da doença.

As evidências mais claras da importância do TNF- α na doença foram obtidas a partir de trabalhos experimentais. CALICH e KASHINO (1998) observaram que camundongos resistentes à infecção por *P. brasiliensis* produzem mais TNF- α e menos

TGF- β em resposta ao fungo. Da mesma forma, camundongos inoculados com isolados avirulentos do *P. brasiliensis* produzem níveis elevados de TNF- α , quando comparado com camundongos infectados por isolados virulentos, sugerindo que esta citocina possa ter papel na modulação da resposta ao fungo (FIGUEIREDO et al, 1993).

O principal indutor da produção de IFN- γ e indiretamente de TNF- α é a IL-12, produzida principalmente por APC, macrófagos e neutrófilos (GATELY et al, 1998). Em nosso trabalho a detecção de IL-12 no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico foi mais elevada em pacientes com forma adulta da PCM, seguido do grupo PCM-infecção. Esses dados requerem confirmação, mas estão de acordo com observações de que a produção de IL-12, assim como o IFN- γ são indicadores de diferenciação Th1 (ROMANI et al, 1994).

Entre as múltiplas atividades da IL-12, está a de induzir a expressão de perforinas e serina esterase em células NK e a produção de IFN- γ nessas células e em linfócitos T (PERAÇOLI et al, 1991, 1995; CESANO et al, 1993). Estas são condições críticas para o desenvolvimento da resposta Th1, levando a ativação de macrófagos e a produção de anticorpos fixadores do complemento. Juntos, o eixo formado entre IL-12 e IFN- γ é essencial para o desenvolvimento do granuloma e a imunidade protetora contra vários microorganismos intracelulares no homem e em camundongos (ROMANI, 1997; GATELY et al, 1998; PARISE-FORTES et al, 2000; SOUTO et al, 2000).

Concluindo, neste trabalho foi possível caracterizar o grupo PCM-infecção como a provável forma de resistência da PCM humana. O padrão de resposta imune deste grupo pode ser definido como Th1, tendo em vista a alta resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo, teste cutâneo de HTT positivo, ausência de anticorpos e produção preferencial de IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α , acompanhados de baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10.

O grupo de pacientes com a forma adulta da doença pode ser classificado como apresentando um padrão intermediário de resposta imune, situado entre a forma juvenil e o grupo PCM-infecção, principalmente tendo como base o padrão de resposta linfoproliferativa, a produção de TNF- α e IL-12.

No pólo de suscetibilidade, ao nosso ver o melhor definido, situa-se a forma juvenil da PCM, definida pela baixa resposta linfoproliferativa, maior produção de IL-4 e IL-5, eosinofilia periférica e tecidual e baixa produção de TNF- α e IL-12 .

Trabalhos estão em andamento em nosso laboratório para avaliar a cinética da produção de citocinas pela expressão de mRNA e proteína, assim como caracterizar as células mais envolvidas em sua produção. Também é nosso objetivo analisar outros parâmetros da resposta imune, como o papel das células T CD8+, principalmente no grupo PCM-infecção. A elucidação dos mecanismos imunoprotetores, que impedem a ocorrência da doença nesses indivíduos, traria grandes benefícios para o entendimento da fisiopatologia da PCM, abrindo caminhos para novas medidas preventivas e terapêuticas.



6- CONCLUSÕES

- A PCM é endêmica na região de Campinas. O estudo realizado com pacientes atendidos no HC/UNICAMP, no período de 1988 a 1996, mostrou uma predominância de pacientes do sexo masculino, com atividades profissionais ligadas à lavoura e, em menor escala, à construção civil. A forma clínica mais prevalente foi a adulta multifocal, com comprometimento pulmonar e de mucosas. O estudo mostrou número considerável de mulheres adultas e crianças (20% de todos os pacientes estudados), com a forma juvenil da doença, mais grave e disseminada. A maioria dos pacientes adultos era tabagista e etilista.
- O estudo da resposta imune celular mostrou diferenças marcantes entre os grupos estudados: indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma juvenil (FJ) e adulta (FA) da paracoccidioidomicose e controles saudáveis.
- O grupo PCM-infecção foi caracterizado como a forma de resistência da doença, tendo em vista que não desenvolvem a doença e apresentam resposta predominante do tipo Th1, com produção de citocinas estimuladoras da resposta imune como IL-2, IFN- γ e TNF- α , com altos índices de proliferação linfocitária e teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo a antígenos do fungo.
- Os pacientes com a FJ constituem o pólo de suscetibilidade, com resposta imune padrão Th2, que justifica a forma mais grave e disseminada da doença. Apresentam produção de citocinas supressoras da resposta imune, como IL-4, IL-5 e IL-10, proliferação linfocitária baixa e teste cutâneo de hipersensibilidade tardia negativo. Produzem anticorpos específicos da classe IgG4 e IgE e apresentam eosinofilia periférica e tecidual.
- Os pacientes com a FA apresentam resposta imune bastante heterogênea, variando de acordo com a forma unifocal ou multifocal da doença, o que permite classificá-los como um padrão intermediário entre o Th2 apresentado pela forma juvenil e o Th1 apresentado pelo grupo infectado não doente.



***7- REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ALMEIDA, S. R.; MORAES, J. Z.; CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol**, 190: 68-76, 1998.

ANDRADE, J. A. F. **Avaliação da frequência de micoses sistêmicas e oportunistas em pacientes com doenças pulmonares: Estudo clínico e sorológico no Hospital Otávio Mangabeira**. Salvador, 1987 (Dissertação – Mestrado - Universidade Estadual da Bahia).

ANJOS, A. R.; CALVI, S. A.; FERRACINI, R.; PERAÇOLI, M. T.; SILVA, C. L.; SOARES, A. M. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med Mycol**, 40: 377-82, 2002.

ARRUDA, C. FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. et al. Interleukin 12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin Immunol**, 103:185-95, 2002.

BAIDA, H.; BISELLI, P. J.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, 1(4): 273-8, 1999.

BANCHERAU, J.; ROSSET, F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation. **Adv Immunol**, 52: 125-45, 1992.

BARBOSA, W. Paracoccidioidomycose (Blastomicose Sul-Americana). In: AMATONETO, V. **Doenças transmissíveis**. Ed. Sarvier, 1991, p. 653-62.

BAUMGARDNER, D.; PARETSKY, D. P.; YOPP, A. C. The epidemiology of blastomycosis in dogs: north central Wisconsin, USA. **J Med Vet Mycol**, 33: 171-6, 1995.

BENARD, G.; ORII, N. M.; MARQUES, H. S.; MENDONÇA, M.; AQUINO, M. Z.; CAMPEAS, A. E. et al. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. **Pediatr Infect Dis J**, 13: 510-5, 1994.

BENARD, G.; DURANDY, A.; ASSIS, C. M.; HONG, M. A.; ORII, N. M.; SATO, M. N. et al. Responses of T and B lymphocytes to a *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects. **Am J Trop Med Hyg**, 53: 189-94, 1995.

BENARD, G.; HONG, M. A.; DEL NEGRO, G. M. B.; BATISTA, L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; DUARTE, S. J. S. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, 54: 7-12, 1996.

BENARD, G.; MENDES-GIANINI, M. J. S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E. T.; DUARTE, A. J. S. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J Inf Dis**, 175:1263-7, 1997.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, 13 (4): 248-52, 2001.

BETHLEM, E. P.; CAPONE, D.; MARANHÃO, B.; CARVALHO, C. R.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Curr Opin Pulm Med**, 5: 319-25, 1999.

BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with the clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, 31: 671-676, 1993.

BLOTTA, M. H. S. L. **Paracoccidioidomicose na região de Campinas - avaliação das técnicas de imunodifusão, ELISA e Western Blot frente a diferentes preparações antigênicas, para diagnóstico e acompanhamento sorológico**. São Paulo, 1993 (Tese – Doutorado - Escola Paulista de Medicina).

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin-10. **J Exp Med** 174: 1549-57, 1991.

BORELLI, D. Prevalence of systemic mycosis in Latin America. In: Proc. Int. Symp. Mycoses. Publ. N° 205. Pan American Health Organization, Washington, D. C., 1970.

BORELLI, D. Some ecological aspects of paracoccidioidomycosis. In: Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis. Medellin, 1971. **Proceeding**. Washington D.C., PAHO Scientific Publication, nº 254, p. 59-64, 1972.

BRUMMER, E.; HANSON, H. L.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. In vivo and in vitro activation of pulmonar macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J Immunol**, 140: 2786-9, 1988.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clin Microbiol Rev**, 6: 89-117, 1993.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidem Infect**, 111: 121-3, 1993.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, A. M.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1994, p.151-78,

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz J Med Biol Res**, 31: 615-23, 1998.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res Immunol**, 149: 407-17, 1998.

CAMARGO, Z. P.; GUESDON, J. L.; DROUHET, E.; IMPROVISI, L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelctrophoresis and erythroimmunoassays. **Mycopathologia**, 88: 31-7, 1984.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen for immunodifusion tests. **J Clin Microbiol**, 26:2147-51, 1988a.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Analysis by western blotting of the serological response in paracoccidioidomycosis. **Revista Iber Micol**, 5: 70, 1988b.

CAMARGO, Z. P.; GESZTESI, J. L.; SARAIVA, E. C. O.; TABORDA, C. P.; VICENTINI, A. P.; LOPES, J. D. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, 32: 2377-81, 1994.

CAMARGO, Z. P.; BARUZZI, R. G.; MAEDA, S. M.; FLORIANO, M. C. Antigenic relationship between *Loboa loboi* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. **Med Mycol** 36: 413-17, 1998.

CANO, L. E.; ARANGO, R.; SALAZAR, M. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.; RESTREPO, A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J Med Vet Mycol**, 30: 161-6 1992.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect immun**, 63: 1777-83, 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, 66: 800-6, 1998.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect Immun**, 56: 1171-7, 1988.

CESANO, A.; VISONNEAU, S.; CLARK, S. C.; SANTOLI, D. Cellular and molecular mechanism of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. **J Immunol**, 151: 2943-57, 1993.

CHEQUER-BOU HABIB, D.; DANIEL-RIBEIRO, C.; BANIC, D. M.; VALE, A. C. F.; GALVÃO-CASTRO, B. Policlonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 108: 89-93, 1989.

COHEN, M. C.; COHEN, S. Cytokine function. A study in biologic diversity. **Am J Clin Pathol**, 105: 589-98, 1996.

CONTI-DIAZ, I. A.; SOMMA-MOREIRA, R. E.; GEZUELE, E.; DE GIMENEZ, A. C.; PENA, M. I.; MACKINNON, J. E. Immunoelctrosmophoresis-immunodifusion in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, 11: 39-41, 1973.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C. et al. Paracoccidioidomycosis: mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro 18(5): 1441-54, 2002.

D' ANDREA, A.; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N. M.; CHEHIMI, J.; KUBIM, M.; ASTE, M. et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **J Exp Med**, 176: 1387-98, 1992.

DAY, K. P. The endemic normal in lymphatic filariasi: a static concept. **Parasitol Today**, 7: 341-3, 1991.

DEEPE, G. S. Jr.; ROMANI, L.; CALICH, V. L.; HUFFNAGLE, G.; ARRUDA, C.; MOLINARI-MADLUM, E .E. et al. Knockout mice as experimental models of virulence. **Med Mycol**, 38: 87-98, 2000.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; SIQUEIRA, A. M. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**, CRC Press, Boca Raton, p. 225-32, 1994.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, 118: 503-8, 2000.

ESSER, C.; RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annu Rev Immunol**, 8: 717-35, 1990.

FAVA-NETO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul americana com antígeno polissacarídico. **Arq Cir Clin Exper**, 18: 197-254, 1955.

FIGUEIREDO, F.; ALVES, L. M. C.; SILVA, C. L. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *P. brasiliensis* and the wall fractions thereof. **Clin Exp Immunol**, 93: 189-94, 1993.

FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F.; BECKMAN, M. P.; PARK, L. S. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, 8: 303-33, 1990.

FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R. G.; MENDES, R. P.; MARCOS, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, 20: 129-32, 1987.

FRANCO, M. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, 25: 5-18, 1987.

FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; RESKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Baillieres Clin Trop Med Commun Dis**, 4: 185-220, 1989.

FREITAS DA SILVA, G.; MARTINEZ, R.; NASCIMENTO, M. M. P.; BRAGHETO, I. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Detecção e identificação de antígenos circulantes em pacientes com paracoccidioidomicose associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. **Revista Argent Micol**, 15: 47, 1992.

FONSECA, E. R. S.; PARDAL, P. P. O.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomicose em crianças em Belém do Pará. **Revista Bras Méd Trop**, 32: 31-3, 1999.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde (on line). Arquivo disponível em <http://www.datasus.gov.br/cgi/sim/dxopcao.htm>. Capturado em maio de 2000.

GARCIA, N. M.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Antigenemia in the isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 13, p. 183, **abstr. P419**, Salsomaggiore, 1994.

GATELY, M. K.; RENZETTI, L. M.; MAGRAM, J.; STERN, A. S.; ADORINI, L.; GUBLER, U. et al. The interleukin-12 / interleukin-12 receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol**, 16: 495-521, 1998.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; JAMES, S. L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ activated macrophages. **J Immunol**, 148: 1792-6, 1992.

- GIMENEZ, M. E. Paracoccidioidomycosis. **Actual Terap Dermatol**, 21: 182-92, 1998.
- GOLDANI, L. Z.; SUGAR, A. M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, 58(2): 152-3, 1998.
- GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; DE CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, 38(9): 3478-80, 2000.
- GOMEZ, B. L.; FIGUEIROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; ORTIZ, B.; ROBLEDO, M. A.; HAY, R. J. et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. **J Clin Microbiol**, 35: 3278-83, 1997.
- GOMEZ, B. L.; FIGUEIROA, J. I.; HAMILTON, A. J.; DIEZ, S.; ROJAS, M.; TOBON, A. M. et al. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. **J Clin Microbiol**, 36(11): 3309-16, 1998.
- GONÇALVES, A. J. R.; SOMOGY, L. A.; BRAGA, M. P.; PEDROSA, M. C.; CARVALHO, F. G.; VIEIRA, A. R. M. et al. Paracoccidioidomycose (blastomycose sul-americana). Experiência de um hospital geral. **Arq Bras Med**, 58: 237-43, 1984.
- GONZALES, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, 68 (5): 2546-52, 2000.
- GROUX, H.; POWRIE, F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. **Immunol Today**, 20: 422-46, 1999.
- HINO, A.; IGARASHI, O.; IAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; NARIUCHI, H. Interferon- γ priming is not critical for IL-12 production of murine spleen cells. **Cytokine**, 12: 12-20, 2000.
- HOSTETLER, J. S.; BRUMMER, E.; COFFMAN, R. L.; STEVENS, D. A. Effect of anti-IL-4, IFN- γ and an antifungal triazole (SCH42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with the outcome. **Clin Exp Immunol**, 94: 11-6, 1993.

KARHAWI, A. S.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med Mycol**, 38: 225-9, 2000.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A.; BURGER, E. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J Interferon Cytokine Res**, 20: 89-97, 2000.

KULLBERG, B. J.; ANAISSIE, E. J. Cytokines as therapy for opportunistic fungal infections. **Res Immunol**, 149 (4-5): 478-88, 1998.

KURITA, N.; OARADA, M.; MIYAJI, N.; ITO, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, 38: 177-82, 2000.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACARI-HEINS, E. M.; MELLO, N. T. Paracoccidioidomycose. In **Micologia Médica**, 9ª ed., S. Paulo, Sarvier Editora, 2002, p. 639-729.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomycosis. A clinical and mycologic study of forty-one cases observed in Santa-Maria, R.S., Brazil. **Am J Med**, 52: 771-5, 1972.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomycose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J Pneumol**, 16: 129-32, 1990.

MAGEE, D. M.; COX, R. A. Interleukin-12 regulation of host defenses against *Coccidioides immitis*. **Infect Immun**, 64: 3609-13, 1996.

MAMONI, R. L.; NOUER, S. A.; OLIVEIRA, S. J.; MUSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, 40: 153-9, 2002.

- MANGIATERRA, M.; ALONSO, J.; GALVAN, M.; GIUSIANO, G.; GORODNER, J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 38 (5): 349-53, 1996.
- MARQUES, S. A., FRANCO, M.; MENDES, R. P.; SILVA, N. C. A.; BACCILLI, C.; CURCELLI, E. D. et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 25: 87-92, 1983.
- MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Rev Saúde Pública**, 26: 12-16, 1992.
- MARTIN-OROZCO, N.; ISIBASI, A.; ORTIZ-NAVARRETE, V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- γ activation. **Immunology**, 103: 41-8, 2001
- MASON, D. The role of B cells in the programming of T cells for IL-4 synthesis. **J Exp Med**, 183: 717-9, 1996.
- MATTOS, M. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES-MACHADO, J.; MEIRA, D. A.; MORCELLI, J.; PEREIRA, P. C. et al. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, 114: 187-91, 1991.
- McEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, 26: 305-6, 1995.
- MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? **Parasitol Today**, 16: 95-101, 2000.
- MELLO, L. M. ; SILVA-VERGARA, M.; RODRIGUES, J. V. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th2 immune response characterized by IL-4 and IL-5 production. **Hum Immunol**, 63: 149-54, 2002.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V. et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am J Trop Med Hyg**, 43: 200-6, 1990.

MONTENEGRO, M. R. G. Formas clínicas da paracoccidiodomicose. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 28: 203-4, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. Th1 and Th2 cells: different patterns of cytokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, 7: 145-73, 1989.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. **Advances in Immunology**, 56: 1-26, 1994.

MOTA, N. G. S.; RESKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLLI, M. T. S.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J. et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidiodomycosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 79: 765-72, 1985.

MOTA, C. C. S. Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastomicose sul americana no Paraná. **Ann Fac Med Univ Fed Paraná**, 9-10: 53-92, 1996.

MUSATTI, C. C.; RESKALLAH, M. T.; MENDES, E.; MENDES, N. F. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidiodomycosis. **Cell Immunol**, 24: 365-78, 1976.

MUSATTI, C. C.; PERAÇOLLI, M. T. S.; SOARES, A. M. V. C.; RESKALLAH-IWASSO, M. T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidiodomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidiodomycosis**. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1994, p.175-86.

NEGRONI, R. Paracoccidiodomycosis (South American blastomycosis, Lutz, mycosis). **J Dermatology**, 32: 847-59, 1993.

NEVES, A. R.; MAMONI, R. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. Negative immunodiffusion tests in sera of paracoccidiodomycosis patients may be related to low avidity IgG2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clin Diag Lab Immunol**, (in press), 2003.

NEWORAL, E. P. M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; NORONHA, I. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Immunocytochemical localization of cytokines and lymph nodes of patients with paracoccidiodomycosis. **Cytokine**, (in press), 2003.

O´GARRA, A. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem Immunol**, 63: 1-13, 1996.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; ALTEMANI, A.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. Evidence of a T helper type 2 activation in the juvenile form of paracoccidioidomycosis. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY, 24, 1999, Águas de Lindóia, **Abstr**, p.118, 1999.

OSWALD, I. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; JAMES, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-B to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J Immunol**, 148: 3578-82, 1992.

ONO, M.A. **Contribuição ao estudo da eco-epidemiologia do *Paracoccidioides brasiliensis***. São Paulo, 2000 (Tese - Doutorado - Universidade Federal de São Paulo).

OPAL, S. M.; DE PALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, 117: 1162-72, 2000.

PARISE-FORTES, M. R.; SILVA, M. F.; SUGIZAKI, M. F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M. R.; SOARES, A. M. et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Med Mycol**, 38(1): 51-60, 2000.

PERAÇOLI, M. T. S.; SOARES, A. M. V. C.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; PEREIRA, P. C. M.; RESKALLAH-IWASSO, M. T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol**, 29: 373-80, 1991.

PERAÇOLI, M. T.; FORTES, M. R.; DA SILVA, M. F.; MONTENEGRO, M. R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev Ins Med Trop São Paulo**, 37(2):129-36, 1995.

RESTREPO, A. The immunodiffusion technic in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Sabouradia**, 4: 223-30, 1966.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, 46: 346-53, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, 23: 323-34, 1985.

RESKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T. S.; MENDES, R. P.; GUASTALE, H.; BARRAVIERA, B.; MARQUES, S. A. et al. Defective expression of interleukin-2 receptors in patients with paracoccidioidomycosis. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4, 1989, Caracas, **Resúmenes** I-21, Venezuela, 1989.

RIOS-GONÇALVES, A. J. A eosinofilia em crianças de 3 a 7 anos com paracoccidioidomycose. **Arq Bras Pediat**, 4: 66-109, 1997.

ROBLES, A. M.; ARECHEVALA, A. I.; NEGRONI, R.; FINQUELIEVICH, J. L. Estudio de algunas técnicas inmunológicas en pacientes com paracoccidioidomycosis. **Rev Arg Micol**, 13: 15-25, 1990.

ROMAGNANI, S. Biology of human Th1 and Th2 cells. **J Clin Immunol**, 15: 121-9, 1995.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Ann Allergy Asthma Immunol**, 85: 9-21, 2000.

ROMANI, L.; MOCCI, S.; BIETTA, C.; LANFALONI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th1 responses with acquired resistance. **Infect Immun**, 59: 4647-54, 1991.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; GROHMANN, U.; MOCCI, S.; MOSCI, P.; PUC CETTI, P. et al. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. **J Exp Med**, 176: 19-24, 1992.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; TONNETTI, L.; SPACCAPELO, R.; CENCI, E.; WOLF, S. et al. Interleukin-12 but not interferon- γ production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis. **Eur J Immunol**, 24: 909-15, 1994.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Curr Opin Immunol**, 9: 484-90, 1997.

- ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, 18 (3): 149-57, 2002.
- RUMBLEY, C. A.; SUGAYA, H.; ZEKAVAT, A. S.; REFAEI, M. E.; PERRIN, P. J.; PHILLIPS, S. M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in schistosome granuloma. **J Immunol**, 162: 1003-9, 1999.
- SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect Immun**, 56: 711-3, 1988.
- SALINA, M. A.; SHIKANAI-YASSUDA, M. A.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, B.; GIANNINI, M. J. M. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **J Clin Microbiol**, 36: 1723-8, 1998.
- SARAIVA, E. C. O.; ALTEMANI, A.; FRANCO, M. F.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMARGO, Z. P. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. **J Med Vet Mycol**, 34: 155-61, 1996.
- SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: Cell wall structure and virulence. A review. **Mycopathologia**, 62: 77-86, 1977.
- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Med Vet Mycol**, 31: 99-113, 1993.
- SCOTT, P.; KAUFMANN, S. H. E. The role of T-cell subsets and cytokines in regulation of infection. **Immunol Today**, 12: 62-6, 1991.
- SEVERO, L.; ROESCH, E. W.; OLIVEIRA, E. A.; ROCHA, M. M.; LONDERO, A. T. Paracoccidioidomycosis in women. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 15: 88-9, 1998.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; HIGAKI, Y.; UIP, D. E.; MORI, N. S.; DEL NEGRO, G.; MELO, N. T. et al. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidioidomicose. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 34: 85-90, 1992.

- SILVA, C. L.; FIGUEIREDO, F. Tumor Necrosis Factor in Paracoccidioidomycosis. **J Infect Dis**, 164: 1033-4, 1991.
- SILVA, C. L.; SILVA, M. F.; FACCIOLI, L. H.; PIETRO, R. C. L.; CORTEZ, S. A. E.; FOSS, N. T. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Immunol**, 101: 314-20, 1995.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, 36: 37-42, 1998.
- SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection mice. **Am J Pathol**, 156 (5): 1811-20, 2000.
- SOUZA, A. R.; GESZTESI, J. L.; DEL NEGRO, G. M.; BENARD, G.; SATO, J.; SANTOS, M. V. et al. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, 7 (2): 175-81, 2000.
- TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen gp 43. **J Med Vet Mycol**, 31: 155-60, 1993.
- TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43 kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect Immun**, 66: 786-93, 1998.
- TELLES FILHO, F. Q.; BRANDÃO, H. E.; BOSCARDIN, R.; MACEDO, E.; BARROS, J. A.; MARQUETTI, J. L. et al. Alguns aspectos clínicos e epidemiológicos da paracoccidioidomicose no Estado do Paraná. **Rev Soc Bras Med Trop**, 19: 93, 1986.
- TRINCHIERI, G. Interleukin 12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol Today**, 14: 335-8, 1993.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, 84: 4008-27, 1994.

VIANA, I. R. C.; SHER, A.; CARVALHO, O. S.; MASSARA, C. L. Interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells from residents of area endemic for *S. mansoni*. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**, 88: 466-70, 1994.

WAGNER, J. M.; FRANCO, M.; KEPHART, G. M.; GLEICH, G. J. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. **Amer J Trop Med Hyg**, 59: 66-72, 1998.

WANKE, B.; LONDERO, A. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Ed. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1994, p.109-120.

ZHOU, P.; SIEVE, M. C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K. J.; TEWARI, R. P.; GAZZINELLI, T. et al. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN- γ . **J Immunol**, 155: 785-95, 1995.



8- APÊNDICE

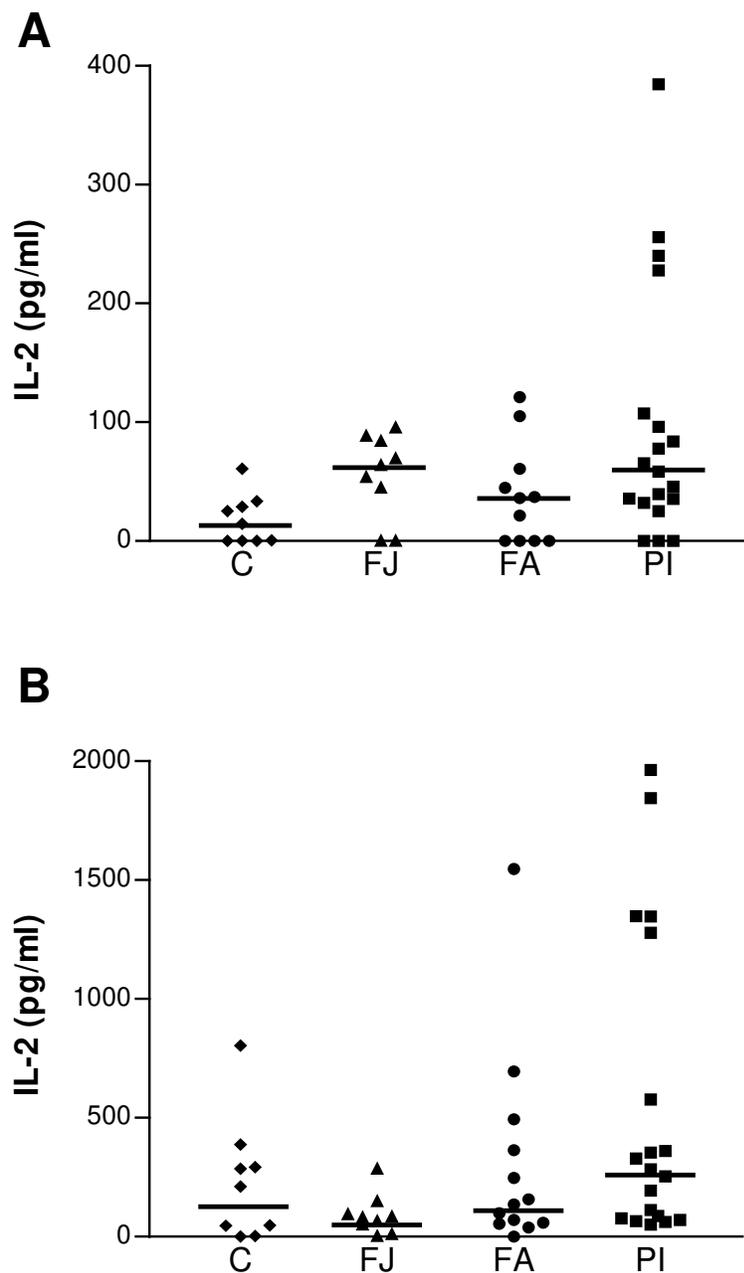


Figura 1 – Níveis de IL-2 produzidos por PBMC de pacientes com a forma adulta (FA), forma juvenil (FJ) da PCM, por indivíduos com PCM-infecção (PI) e controles não infectados (C), em resposta a antígenos do *Paracoccidioides brasiliensis* (PbAg – 1µg/mL – **A**) ou fitohemaglutinina (PHA – 10µg/mL – **B**). **A:** C vs. FJ, $p=0,04$; C vs. PI, $p=0,01$. **B:** FJ vs. PI, $p=0,04$. As barras horizontais representam a mediana. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas e dosados pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando anticorpo de captura (MAB602) e anticorpo biotilado (BAF202) da R&D Systems.

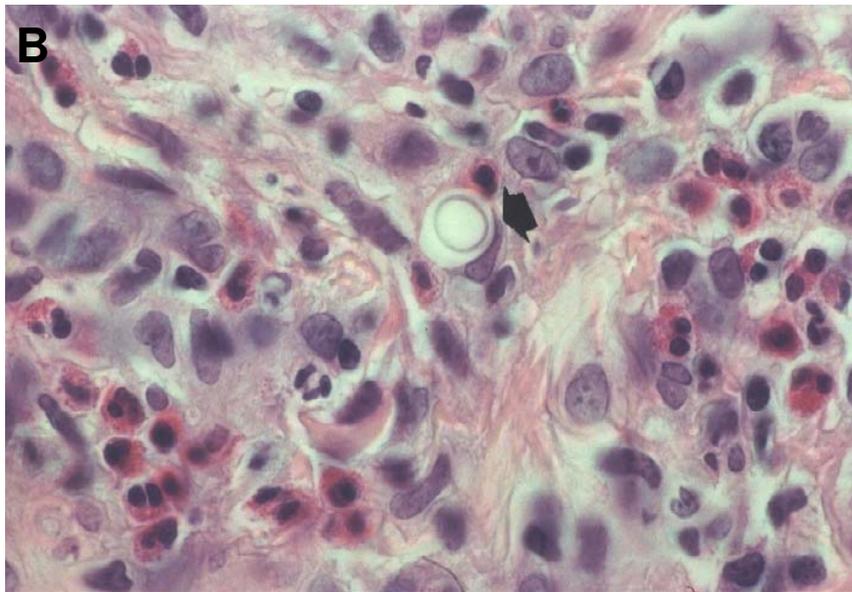
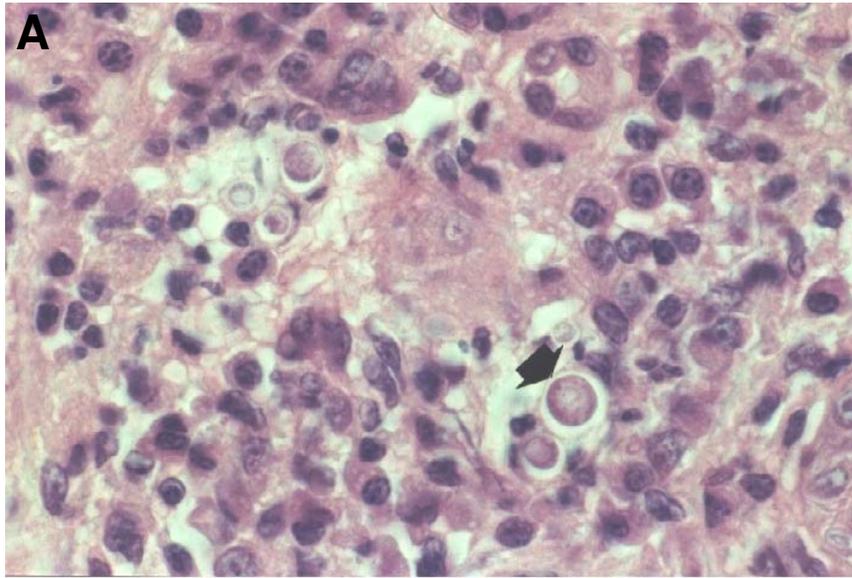


Figura 2 – Cortes histológicos de mucosa oral de pacientes com a forma adulta (**A**) ou forma juvenil (**B**) da PCM. Nota-se um rico infiltrado eosinofílico no tecido do paciente com a FJ, ao redor de leveduras de *P. brasiliensis* (seta preta). Coloração: Hematoxilina-eosina (aumento 400 x).

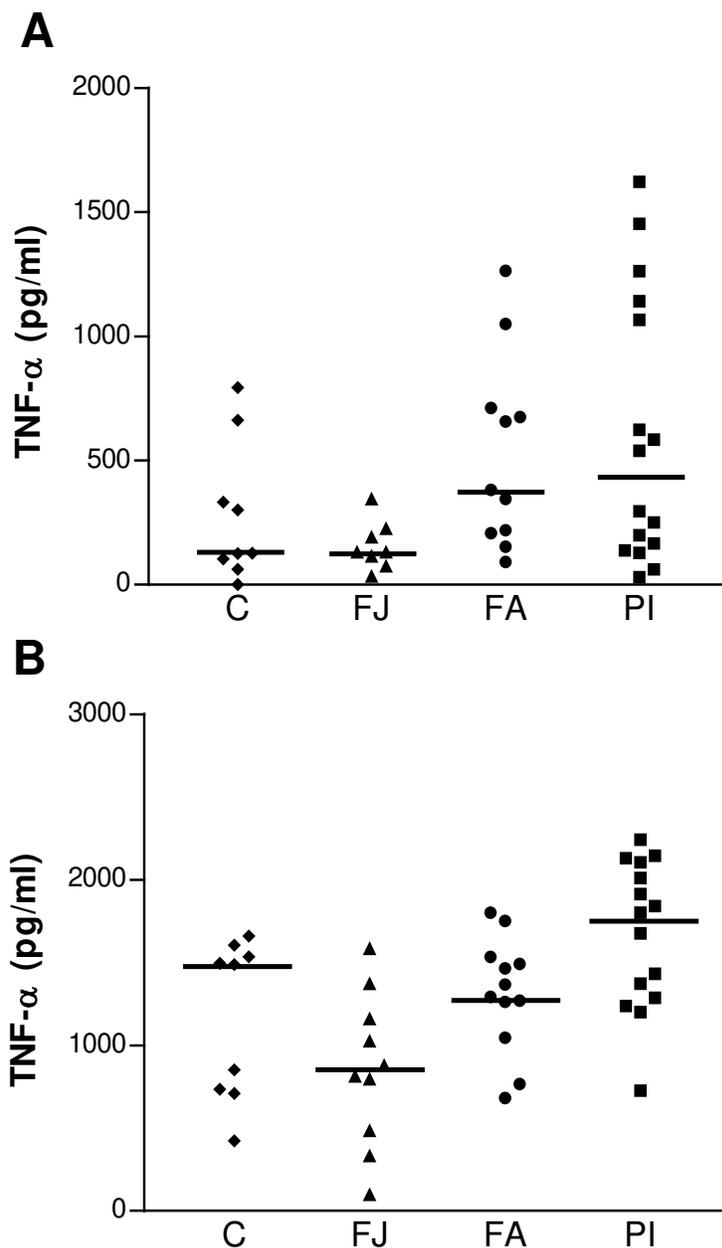


Figura 3 – Níveis de TNF- α produzidos por PBMC de pacientes com a forma adulta (FA), forma juvenil (FJ) da PCM, indivíduos com PCM-infecção (PI) e controles não infectados (C), em resposta a antígenos do *Paracoccidioides brasiliensis* (PbAg – 1 μ g/mL – **A**) ou fitohemaglutinina (PHA – 10 μ g/mL – **B**). **A:** FJ vs. FA, $p=0,02$; FJ vs. PI, $p=0,03$. **B:** FJ vs. FA, $p=0,04$; FJ vs. PI, $p=0,003$; FA vs. PI, $p=0,03$. As barras horizontais representam a mediana. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas e dosados pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando anticorpo de captura (MAB610) e anticorpo biotilado (BAF210) da R&D Systems.